



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Materiales Poliméricos

“Estudio de la modificación superficial de un andamio de PGS con PPy-I utilizando plasma y su citotoxicidad con células troncales de pulpa dental hDPSCs”

Tesis que presenta

M.C Gaspar Eduardo Martín Pat

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(MATERIALES POLIMÉRICOS)

Mérida, Yucatán, Noviembre 2020

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS MATERIALES POLIMÉRICOS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Gaspar Eduardo Martin Pat** titulado “**Estudio de la modificación superficial de un andamio de PGS con PPy-I utilizando plasma y su citotoxicidad con células troncales de pulpa dental hDPSCs**”, fue realizado en la Unidad de Materiales, línea de investigación materiales para medicina regenerativa, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Fernando Hernández Sánchez y codirección de la Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes, y pertenece al Programa de Posgrado en Materiales Poliméricos de este Centro.

Atentamente



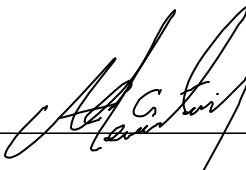
Dra. Cecilia Hernández
Zepeda Directora de
Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 23 de noviembre de 2020.

Mérida Yucatán, México; a 23 de noviembre de 2020

DECLARACION DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



Gaspar Eduardo Martin Pat

Los resultados de este trabajo fueron publicados en:

- G. E. Martín-Pat, N. Rodríguez-Fuentes, J. M. Cervantes-Uc, R. Rosales-Ibáñez, H. J. Carrillo-Escalante, A. F. Ku-González, F. Hernández-Sánchez, Effect of different exposure times on physicochemical, mechanical and biological properties of PGS scaffolds treated with plasma of iodine-doped polypyrrole. *Journal of Biomaterials Applications*. 35(4-5), 485-49, 2020. DOI: 10.1177/0885328220941466

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada Núm. de CVU 510474, para cubrir los gastos de manutención.

A mis asesores el **Dr. Fernando Hernández Sánchez** y la **Dra. Nayeli Rodríguez Fuentes**, al **Dr. Hugo Joel Carillo Escalante** y a mis compañeros de laboratorio, por sus enseñanzas, apoyo, dedicación y compañerismo a lo largo de la elaboración de la presente tesis.

A mis tutores, el **Dr. José Manuel Cervantes Uc** y al **Dr. Raúl Rosales Ibáñez** por todas las observaciones hechas para mejorar la calidad de este trabajo.

A la **I.Q.I Silvia Andrade**, por las micrografías SEM y por sus recomendaciones para la realización de esta tesis. Al **Dr. Pascual Bartolo Pérez** y al **Ing. William Javier Cauich** por los resultados XPS llevados a cabo en el laboratorio nacional de nano y biomateriales, Cinvestav-IPN

Agradezco de manera especial al **Dr. Alejandro Ávila** por las facilidades brindadas para realizar la modificación con plasma de los andamios en la FIQ-UADY, y por su amistad.

A **mi madre y hermanos** que siempre estuvieron presente demostrando su apoyo incondicional, cariño y atenciones conmigo durante esta etapa.

A **mi hija Regina Martin** y **esposa Andrea Pool** que me han enseñado lo importante y maravilloso que puede ser la vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XII
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
HIPÓTESIS	5
OBJETIVOS	5
OBJETIVO PRINCIPAL	5
OBJETIVOS ESPECIFICOS	5

1. ANTECEDENTES

1.1 Biomateriales	6
1.2 Ingeniería tisular utilizando andamios tridimensionales	6
1.4 Células troncales	8
1.5 Aplicaciones en ingeniería tisular de las células troncales mesenquimales:	9
1.6 La pulpa dental y células troncales de pulpa dental (hDPSCs)	11
1.6.2 Aislamiento y cultivo de las hDPSCs	15
1.6.3 Células troncales mesenquimales y fenotipo mesenquimal de la población de la pulpa dental (hDPSCs)	16
1.7 Polímeros utilizados en ingeniería tisular	17
1.7.1 Poli (glicerol sebacato) (PGS)	17
1.8 Técnicas de fabricación de andamios	26
1.8.1 Electrohilamiento	26
1.8.2 Lixiviación de partículas	27
1.8.3 Solidificación/liofilización	28
1.9 Modificación superficial del PGS	29
1.9.1 Modificación superficial por plasma con monómero bioactivos	29
1.10 Planteamiento del problema	35

1.11 Justificación	36
--------------------------	----

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Reactivos	38
2.2 Síntesis del andamio	38
2.2.1 Síntesis del pPGS	38
2.2.2 Preparación de andamios PGS.....	38
2.3 Caracterización fisicoquímica de los andamios de PGS fabricados por lixiviado	39
2.3.1 Análisis elemental mediante la energía de rayos X dispersivos (EDX)	39
2.3.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	39
2.2.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	39
2.2.4 Determinación del porcentaje de Porosidad	39
2.2.5 Porcentaje de hinchamiento y densidad de entrecruzamiento	40
2.2.6 Área superficial específica mediante la técnica Brunauer, Emmett y Teller (BET).....	41
2.2.7 Análisis termogravimétrico (TGA) del pPGS y PGS.....	42
2.2.8 Ensayos mecánicos a tensión de los andamios PGS 80/20, 70/30 y 60/40.	42
2.2.9 Pérdida de masa de los andamios obtenidos a diferentes porcentajes de pPGS y NaCl.....	42
2.3 Tratamiento superficial de los andamios PGS con PPy-I.....	43
2.4 Caracterización fisicoquímica del andamio de PGS tratado con PPy-I.....	43
2.4.1 Análisis elemental mediante la energía de rayos X dispersivos (EDX)	43
2.4.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) de las partículas PPy-I.....	43
2.4.3 Espectroscopia UV visible de las partículas PPy-I.....	44
2.4.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)	44
2.4.5 Rugosidad con microscopia de fuerza atómica (AFM).....	44
2.4.6 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	44
2.4.7 Espectroscopia Raman.....	44
2.4.8 Espectroscopia Fotoelectrónica de rayos X (XPS)	45
2.4.9 Mediciones de Ángulo de contacto	45

2.5 Caracterización mecánica de los andamios tratados con plasma de PPy-I.....	45
2.5.1 Pruebas mecánicas a tensión.....	45
2.6 Caracterización biológica del andamio.....	46
2.6.1 Células troncales de Pulpa dental (hDPSCs).....	46
2.6.2 Caracterización de la población hDPSCs por citometría de flujo	46
2.6.3 Esterilización de muestras	47
2.6.4 Viabilidad celular de los andamios de PGS tratados por contacto directo	47
2.6.5 Morfología celular	48
2.6.6 Evaluación de citotoxicidad por contacto indirecto	48
2.7 Análisis estadístico	49
3. SINTESIS Y OBTENCIÓN DE ANDAMIOS DE PGS	
3.1 Apariencia visual del pPGS sintetizado	50
3.2 Caracterización fisicoquímica de los andamios	50
3.2.1 Análisis elemental EDS de los andamios PGS generados.....	50
3.2.2 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).....	51
3.2.3 Microscopia electrónica de Barrido (MEB), porosidad, y tamaño de poro promedio.	53
3.2.4 Grado de entrecruzamiento por hinchamiento de tetrahidrofurano THF	58
3.2.5 Área Superficial específica por el método de BET (Brunauer, Emmett y Teller)...	60
3.2.6 Análisis termogravimétrico (TGA)	62
3.2.7 Propiedades mecánicas	64
3.2.8 Pérdida de masa	65
4. ANDAMIOS PGS 80/20 TRATADOS CON PLASMA DE PPy-I	
4.1 Caracterización de las partículas de PPy-I	68
4.1.1 Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) de las partículas PPy y PPy-I.....	68
4.1.2 Espectroscopia FTIR de las partículas PPy y PPy/I sintetizado en plasma.	68

4.1.3 Espectroscopia UV visible de las partículas PPy y PPy/I sintetizadas por plasma.	70
4.2 Caracterización de andamio tratados con plasma de PPy-I.....	71
4.2.1 Microscopia electrónica de barrido (MEB).....	71
4.2.3 Microscopia de fuerza atómica (AFM)	74
4.2.4 Espectros FTIR de andamios tratados con PPy sin dopar.	76
4.2.5 Espectros FTIR de andamios tratados con PPy-I	77
4.2.6 Espectroscopia Raman de los andamios tratados	78
4.2.7 Espectroscopia Fotoelectrónica de rayos X (XPS).....	80
4.2.8 Angulo de contacto.....	87
4.2.9 Ensayos mecánicos a tensión.....	88
4.3 Biocompatibilidad del andamio de PGS tratado con PPy-I.....	90
4.3.1 Cultivo y expansión de hDPSCs.....	90
4.3.2 Caracterización de la población hDPSC por citometría de flujo.....	90
4.3.3 Proliferación celular de andamios tratados con hDPSCS.....	91
4.3.4 Morfología de las hDPSCs en contacto directo con andamios PGS	94
4.3.5 Citotoxicidad LIVE/DEAD de las hDPSC en medios acondicionados de los andamios tratados.	94
5. Conclusiones.....	97
6. Recomendaciones	98
7. Bibliografía.....	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Tríada de la Ingeniería tisular. Una matriz tridimensional (llamada andamio), unas células progenitoras y un componente molecular de señalización son necesarios para la creación de implantes	7
Figura 1.2 a) Anatomía dental, donde se observa la ubicación del tejido de la pulpa; b) detalle histológico de una muestra dental.	12
Figura 1.3 Pulpa dental donde se pueden diferenciar las 4 zonas celulares	13
Figura 1.4 Dibujo esquemático de los potenciales sitios de obtención de células troncales postnatales en la cavidad oral	14

Figura 1.5 Las hDPSC y su diferenciación a diferentes multilíneas ectodérmico, mesenquimal y endodérmico.....	15
Figura 1.6 Procesos de obtención del pPGS y el polímero final entrecruzado PGS	19
Figura 1.7 Porcentaje de entrecruzamiento de derivados de PPy bajo la acción del plasma a) monómero de pirrol b) X=33% c) X=40% d) X=70%.....	31
Figura 1.8 Reactor de plasma (proceso de activación de la superficie); el color azul indica la ionización del gas presente.....	31
Figura 1.9 Estructura propuesta por Serratos et al; (a) PPy (X puede tomar cualquier forma de grupos propuesta).....	33
Figura 3.1 EDS de andamios PGS 80/20.....	51
Figura 3.2 Espectros FTIR monómeros y pPGS,	52
Figura 3.3 Andamios PGS 80/20, 70/30 y 60/40.....	53
Figura 3.4 Micrografías MEB de los andamios PGS; a) 80/20; aumento 50 X, recuadro superior derecha; aumento 150 X b) 70/30 y c) 60/40% d) porosidad del andamio con tamaños de porógeno entre 105 μm y 180 μm	55
Figura 3.5 Distribucion de tamaño de poro a) 60/40, b) 70/30 c) 80/20 con un tamaño de porógeno entre 105 μm – 180 μm . No se consideraron los poros mayores de 100 μm	56
Figura 3.6 Micrografías MEB del andamio 80/20; a) de la seccion transversal 50X, b) vista lateral 23X.	58
Figura 3.7 Porcentajes de fracción soluble e hinchamiento de los andamios generados.	59
Figura 3.8 Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno del andamio PGS 80/20	61
Figura 3.9 Distribución del tamaño de poro del andamio PGS 80/20.....	62
Figura 3.10 Pérdida de peso vs temperatura del pPGS y andamio 80/20.....	63
Figura 3.11 Grafica de la derivada de la masa vs temperatura del pPGS y andamio 80/20.	63
Figura 3.12 Curvas esfuerzo vs deformación de los andamios de PGS acondicionados en agua destilada.....	65
Figura 3.13 Porcentaje de masa residual de los andamios PGS 80/20, 70/30 y 60/40.....	67
Figura 4.1 EDX de partículas de PPy-I.	68

Figura 4.2 Espectro FTIR del monómero de pirrol, y las partículas de PPy y PPy-I, a) región 3750- 3850 cm^{-1} b) región 2250-500 cm^{-1}	70
Figura 4.3 Espectroscopia Uv visible de las partículas de PPy y PPy-I.	71
Figura 4.4 Micrografías MEB de andamios de PGS-PPy-I baja magnificación (150 x), alta magnificación (1000 x) y distribución de tamaños de partícula; a) sin tratamiento b) 6 min, c) 12 min, d) 18 min, e) 24 min y f) 30 min.	73
Figura 4.5 Micrografías MEB del andamio tratado a 30 minutos, a) 1700X b) 950X	74
Figura 4.6 AFM películas; a) sin tratamiento; andamios tratados; b)6 min, c)12 min, d)18 min, e)24 min y f)30 min.	75
Figura 4.7 Espectros FTIR de andamios PGS tratados con PPy; a) región 3700-2200 cm^{-1} b) región 1900- 450 cm^{-1}	77
Figura 4.8 Espectros FTIR de andamios PGS tratados con PPy-I; a) región 3700-2200 cm^{-1} b) región 1900- 450 cm^{-1}	78
Figura 4.9 Espectro Raman de andamios PGS tratados con PPy-I	79
Figura 4.10 Análisis en modo de inspección de los andamios PGS-PPy-I; a) sin tratamiento b) 6 min c) 12 min d) 18 min e) 24 min f) 30 min	80
Figura 4.11 Los espectros de alta resolución de la señal C1s deconvolucionados de los andamios de PGS-PPy-I a) sin tratamiento b) 6 min c) 12 min, d) 18 min, e) 24 min, f) 30 min	82
Figura 4.12 Espectros de alta resolución N1s XPS de los andamios de PGS tratados con PPy-I; a) curvas experimentales b) 6 min, c) 12 min, d) 18 min, e) 24 min, f) 30 min	84
Figura 4.13 Los espectros de alta resolución I3d XPS de los andamios tratados; a) curvas experimentales, b) 6 min, c) 12 min, d) 18 min, e) 24 min, f) 30 min.	86
Figura 4.14 Variación del ángulo de contacto de las películas tratadas con; a) PPy-I y b) PPy.	88
Figura 4.15 Propiedades mecánicas de los andamios PGS tratados (n=4, p<0.05) prueba Tukey's ANOVA de una vía a) Módulo de Young b) esfuerzo máximo c) deformación unitaria	89

Figura 4.16 a) hDPSCs migrando del explante Magnificación 4 x. En el cultivo se destaca con un círculo rojo el tejido pulpar b) hDPSCs observadas con microscopio confocal.	90
Figura 4.17 Análisis de citometría de flujo para marcadores de células troncales mesenquimales y hematopoyéticas (CD34, CD45, CD73, CD90 y CD105).	91
Figura 4.18 a) Viabilidad celular (método de contacto directo) de hDPSCs después de 1,3 y 5 días en andamios tratados con PPy-I. ANOVA Tukey's de una vía *p<0.05.	92
Figura 4.19 Micrografías MEB de las células en contacto con el andamio; a1-a4) sin tratamiento, b1-b4) tratado a 6 min.	94
Figura 4.20 Ensayo de tinción LIVE/DEAD; a) control positivo, células cultivadas en DMEM; b) control negativo, células cultivadas en peróxido de hidrogeno; c) andamio sin tratamiento; a-h) andamios tratados con PPy; i-m) andamios tratados con PPy-I. barra 40 µm	96

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Diferentes propiedades mecánicas del PGS reportadas	20
Tabla 1.2 Estudio de biocompatibilidad <i>in vitro</i>	23
Tabla 3.1 Composición química elemental en % atómico de los andamios.....	51
Tabla 3.2 Densidad de entrecruzamiento determinada por el método de hinchamiento.....	60
Tabla 3.3 Propiedades mecánicas de los andamios.....	65
Tabla 4.1 (%) at. PPy-I.....	68
Tabla 4.2 rugosidad (Rrms) y distribución de diámetros promedio de grano de las películas PGS tratadas con PPy-I.....	76
Tabla 4.3 Porcentajes atómicos del carbono, oxígeno, nitrógeno y yodo en los andamios sin tratamiento y tratados.....	81
Tabla 4.4 Porcentaje atómico (%) de las diferentes señales de carbono en los andamios PGS, sin tratamiento y tratado con PPy-I.....	83
Tabla 4.5 Porcentaje atómico (%) de las diferentes señales de nitrógeno en andamios de PGS tratados.....	85

RESUMEN

El poliglicerol sebacato (PGS) es un polímero sintético, elastomérico y biocompatible. En este trabajo se sintetizó a partir de una reacción de policondensación entre el ácido sebácico y el glicerol, y una etapa posterior de entrecruzamiento del material. Hay grandes diferencias entre el producto obtenido en la primera etapa (prepolímero pPGS) y el polímero PGS final ya entrecruzado. La síntesis y el incremento de los enlaces éster se corroboraron por espectroscopia infrarroja (FTIR) y espectroscopia fotoelectrónica de rayos-X (XPS). Se determinaron sus propiedades térmicas por Termogravimetría (TGA), donde se observó que el tiempo de curado es el factor que determina el grado de entrecruzamiento, el cual aumenta si se aumenta dichos tiempos y, por lo tanto, afecta las propiedades finales del material. Los andamios se fabricaron utilizando la técnica de lixiviado con NaCl (Salt leaching por sus siglas en inglés) a diferentes porcentajes de pPGS/NaCl 60/40, 70/30 y 80/20. El incremento de la porosidad conforme se incrementa la cantidad de porógeno y adecuada morfología del andamio 80/20 se corroboraron por microscopia electrónica de barrido SEM. El tamaño de los poros y la dispersión de los andamios indican que la porosidad obtenida pertenece al dominio de los macroporos y depende de la cantidad de porógeno. La mezcla 80/20 ofrece una distribución de poros uniforme, por lo tanto, se seleccionó para su modificación con plasma de polipirrol dopado con yodo (PPy-I). Las modificaciones se realizaron en un reactor de plasma para estudiar el tiempo de exposición en la viabilidad celular. El análisis SEM mostró la formación de partículas de pirrol y un aumento en el tamaño de las partículas a medida que aumentaba el tiempo de exposición, mientras que el análisis de FTIR y XPS indicó un aumento en los grupos $-NH-$ y N^+ en la superficie, lo que se relacionó con el incremento de las partículas de PPy-I. Las mediciones del ángulo de contacto indicaron un aumento en la hidrofiliidad del andamio a mayores tiempos de exposición, lo que también se atribuyó al incremento de partículas de PPy-I. Se observó que el PPy-I incrementa el módulo de Young de los andamios tratados. La proliferación celular en contacto directo con los andamios de PGS tratados mostró un incremento con respecto a los andamios no tratados en los tiempos más cortos. Por otro lado, un aumento en el tiempo de exposición al plasma propicio que la citotoxicidad de los andamios se incrementara.

ABSTRACT

Polyglycerol sebacate (PGS) is a synthetic, elastomeric and biocompatible polymer. In this work, it was synthesized from a polycondensation reaction between sebacic acid and glycerol, and postcuring of the material. There are large differences between the product obtained in the first stage (PGS prepolymer, pPGS) and the cured polymer. The synthesis and the formation of the ester bonds were corroborated by FTIR. Its thermal properties were determined by TGA Thermogravimetry. It was observed that the cure time is the factor that determines the degree of crosslinking, which increases if the time is increased and, therefore, affects the final properties of the material. Once the prepolymer pPGS was obtained, scaffolds were manufactured using salt leaching technique at different percentages of NaCl and pPGS 60/40, 70/30 and 80/20. The increase in the porosity depended on porogen content. The pore size and its dispersity in the scaffolds indicate that the porosity obtained belongs to the macropores domain. The ratio 80/20 offers a uniform porous distribution, therefore it was selected for the plasma modification with PPy-I. The scaffold 80/20 was modified with iodine doped polypyrrole in a plasma reactor in order to study the exposure time on the cell proliferation. SEM analysis showed formation of pyrrole particles and an increase in the particle size as the exposure time was increased, while FTIR and XPS analysis indicated an increase in -NH- and N⁺ groups in surface which was related with the increment of the PPy-I particles. The water contact angle measurements indicated an increase in the scaffold's hydrophilicity at greater exposure times which was also attributed to the increment of PPy-I particles. It was also observed that PPy-I increase young's modulus of the treated PGS scaffolds. Cell proliferation in direct contact on treated PGS scaffolds showed an improvement with regard to non-treated scaffolds. Extracts of treated PGS scaffolds showed high cytotoxicity in direct relation with the exposure time to plasma treatment.

INTRODUCCIÓN

Millones de pacientes en todo el mundo tienen defectos óseos como resultado de traumatismos, anormalidades congénitas, resección de tumores enfermedades deformantes entre otros [1]. La frecuencia de estas condiciones está ligada al crecimiento continuo de la población mundial, particularmente debido al aumento de la esperanza de vida [2]. Las soluciones convencionales a estos problemas incluyen el reemplazo del tejido óseo dañado con injertos óseos autólogos o alogénicos. Los injertos autólogos son el estándar de oro durante la regeneración ósea, pero presentan desventajas para los pacientes, relacionados con el aumento del dolor, la morbilidad y el suministro limitado de hueso obtenido. Las desventajas de las fuentes alogénicas incluyen la respuesta inmunogénica y el rechazo del injerto, que disminuyen la posibilidad de integración del huésped [3]. La ingeniería del tejido óseo ha surgido como un enfoque muy prometedor para el desarrollo de sustitutos óseos biológicamente activos para restaurar, mantener y mejorar el tejido óseo [4].

Actualmente se ha demostrado que las células troncales de pulpa dental (hDPSCs por sus siglas en inglés), han sido fuentes de células para el tratamiento de problemas dentales, así como diversas enfermedades degenerativas [2] . Debido a que este tipo de células pueden generar distintos linajes de células especializadas, que, bajo estímulos específicos se diferencian en diversos tipos de células que incluyen condrocitos, osteoblastos, neuronas entre otros. Debido a su capacidad de diferenciación, facilidad de obtención y a que se pueden encontrar tanto en etapas infantil como adulta, se han desarrollado métodos de aplicación en tejidos dañados.

Las hDPSCs se han utilizado en ensayos *in vitro* [5], estudios preclínicos [6, 7] y humanos [8-10]. Hoy en día, se estudia la posibilidad de utilizar las hDPSCs en conjunto con andamios tridimensionales que posean buenas propiedades mecánicas, químicas y físicas adecuadas para fomentar la adhesión celular, proliferación, diferenciación, organización y vascularización *in vivo*, integración con el tejido huésped, y el reemplazo gradual del andamio por matriz extracelular nueva mientras este se degrada.

El presente trabajo consta de tres capítulos; en el primero se encuentra el marco teórico y los antecedentes referentes al trabajo, el cual presenta información sobre la ingeniería tisular, la técnica de fabricación de andamios, características de los polímeros a utilizar y los aspectos importantes para la fabricación de andamios y las modificaciones superficiales llevadas a cabo con plasma.

En el capítulo 2 se presenta la metodología a partir de las cuales se fabricaron los andamios, las pruebas para determinar las propiedades fisicoquímicas, así como de biocompatibilidad llevadas a cabo en los andamios. En los capítulos 3 y 4, se presentan los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo; de igual manera se proporciona el análisis y discusión de éstos. Posteriormente, se presenta las conclusiones del trabajo y recomendaciones al trabajo y, finalmente las referencias bibliográficas

HIPÓTESIS

El andamio PGS modificado con plasma de PPy-I utilizando plasma a diferentes tiempos de exposición, permitirá obtener un andamio que mantenga la proliferación de células troncales de pulpa dental hDPSCs sin presentar citotoxicidad.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

Estudiar el efecto del tiempo de exposición de un andamio de poli (glicerol sebacato) PGS en el plasma de polipirrol yodo (PPy-I) en las propiedades fisicoquímicas y biológicas con células hDPSCs

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Sintetizar el pPGS y obtener andamios con estructura porosa del PGS entrecruzado, utilizando la técnica de lixiviación de porógeno.
- Modificar superficialmente los andamios de PGS entrecruzado con la incorporación de PPy-I mediante la técnica de polimerización por plasma.
- Caracterizar la morfología (SEM, AFM), estructura química (FTIR, XPS, Raman), área superficial (BET), e hidrofiliidad de los andamios modificados.
- Aislar, cultivar y caracterizar hDPSCs mediante ensayos de inmunofenotipo.
- Evaluar la citotoxicidad de los andamios del PGS entrecruzado y modificados con PPy-I, a través de ensayos de citotoxicidad y viabilidad celular en cultivos *in vitro*.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Biomateriales

El termino biomaterial se refiere a un material diseñado para interactuar con un sistema biológico o vivo con un propósito medico [11]. Diferentes materiales son utilizados para este propósito, por ejemplo: metales, cerámicos y polímeros. Los materiales ocasionan una reacción del cuerpo llamada reacción a cuerpo extraño, por lo que el término biocompatible fue introducido para distinguir los materiales adecuados para este fin. La biocompatibilidad se define como la habilidad de un material para desempeñarse en un ambiente biológico, con una respuesta adecuada del huésped [11]; un material puede ser biocompatible en una aplicación, pero incompatible en otra, dependiendo de la respuesta que produzca. El propósito de los biomateriales es sustituir tejidos dañados, perdidos de manera temporal o de manera permanente. Sin embargo, aun cuando se han utilizado materiales artificiales para ayudar a nuestro cuerpo, quedan muchos temas necesarios a resolver, como la pérdida de función al sustituir un tejido y la falla del material. Un intento de superar estos problemas es la ingeniería tisular, en la cual el objetivo es implantar un biomaterial, cargado con células, que durante un tiempo determinado funcione como un sustituto de la matriz extracelular y, posteriormente se espera que el implante vaya desapareciendo de manera gradual mientras el tejido nuevo y sano se forma.

1.2 Ingeniería tisular utilizando andamios tridimensionales.

Los biomateriales han sido utilizados, de manera tradicional, como un sustituto de la matriz extracelular la cual provee un ambiente favorable para la regeneración del tejido. Uno de los enfoques de la ingeniería tisular es crear un andamio que pueda ser implantado posteriormente en humanos de manera *in vitro* o *in vivo*, funcionando como un refuerzo mecánico y un vehículo celular. Hay cuatro componentes que son clave para el éxito la regeneración tisular en un andamio: 1) el biomaterial elegido, 2) la técnica de fabricación del andamio, 3) el tipo de células, y 4) los métodos de sembrado y cultivo. La idea es que al combinar los avances en estas cuatro áreas se pueda establecer un andamio y un método de

formación tisular que lleven a una regeneración exitosa del órgano receptor. La ingeniería tisular parte del principio de que la regeneración de nuevo tejido puede ser guiada a través de la combinación de células, biomateriales y moléculas bioactivas. Este principio está representado en el gráfico de la Figura 1.1 denominado la tríada de la ingeniería tisular. Esta representación ilustra el hecho de que estos tres elementos deben actuar de manera orquestada para lograr la meta central de crear un tejido nuevo.

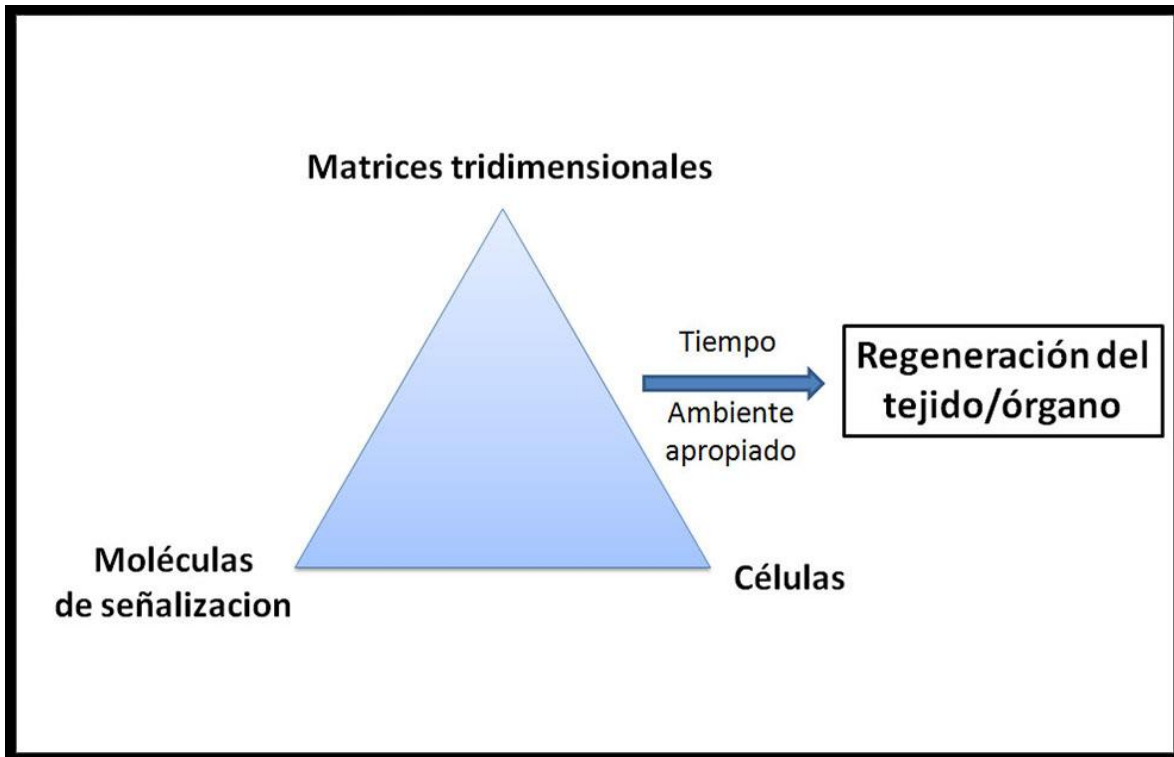


Figura 1.1 Tríada de la Ingeniería tisular. Una matriz tridimensional (llamada andamio), unas células y generalmente un componente molecular de señalización son necesarios para la creación de tejido de novo [12].

Por otro lado, los andamios tridimensionales para la ingeniería tisular (IT) deben satisfacer ciertos criterios:

- 1) Biocompatibilidad. Esto es, que permitan la integración adecuada al tejido huésped sin presentar efectos citotóxicos o genotóxicos, o bien causar respuesta inmune.
- 2) Porosidad. Deben tener poros abiertos e interconectados, necesarios para la difusión de nutrientes, y la remoción de desechos metabólicos como resultado de la actividad

celular, lo cual es fundamental en tejidos, así como la formación de vasos sanguíneos, incluso cuando se realizan procesos *in vitro* [13].

- 3) Tamaño del poro. El tamaño del poro debe estar en un intervalo entre 100 μm y 400 μm [14, 15].
- 4) Propiedades de la superficie. Tanto las químicas como topográficas pueden controlar y afectar la adhesión y proliferación celular [16]. Por ejemplo, las propiedades químicas de la superficie están relacionadas con la habilidad de las células para adherirse al material, mientras que las propiedades topográficas son fundamentales para el proceso mediante el cual las células migran desde la superficie de la matriz tridimensional, que se establece después de implantado en el material [17].
- 5) Propiedades mecánicas. Depende del lugar de implantación y de las fuerzas mecánicas a las que se verá expuesto el implante. Las propiedades mecánicas deben ser similares al tejido en el cual será implantado, además de ofrecer suficiente soporte mecánico a las células hasta que la nueva matriz extracelular sea producida por ellas mismas.
- 6) Biodegradabilidad. Para la fabricación de las matrices se deben utilizar materiales que tengan tasas de resorción que iguallen a las de formación del tejido, de tal manera que, para cuando la lesión esté totalmente regenerada, la matriz tridimensional se haya degradado totalmente [18].
- 7) Comercialización. La síntesis de los biomateriales y la fabricación de los andamios deben ser adecuados para su comercialización [19].

1.4 Células troncales

Las células troncales son células indiferenciadas con potencial de proliferación elevado, con capacidad de auto renovarse y de generar uno o más tipos de células que desempeñan funciones especializadas en el organismo [20, 21]. En condiciones normales no se dividen, pero si hay alguna lesión en los sitios donde estas células se encuentran, éstas se diferencian y favorecen el proceso de regeneración. Las células troncales pueden ser clasificadas por su origen en: embriogénicas y postnatales adultas, siendo estas últimas las más utilizadas en investigación [22].

Existen diferentes tipos de células troncales y se les clasifica según su plasticidad: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales. Las células totipotenciales son aquellas capaces de diferenciarse en cualquier tipo de célula del embrión o tejidos extraembrionarios. Las pluripotenciales son aquellas que pueden dar lugar a todos los tipos de células en el embrión (sin incluir tejidos extraembrionarios). Tanto las células troncales embrionarias, como las epiteliales amnióticas son pluripotenciales. Las células multipotenciales ya no poseen la capacidad de diferenciarse en todo tipo de células, pero mantienen la habilidad de diferenciarse en varios tipos de células. Las células fetales, del cordón umbilical y las células troncales específicas de un tejido, como las mesenquimales y hematopoyéticas, son de esta categoría [23]. Por otro lado también están las células de los tejidos adultos se encuentran diferenciadas, permanecen de esa manera y eventualmente pierden su capacidad de proliferación [21].

1.5 Aplicaciones en ingeniería tisular de las células troncales mesenquimales:

Las células óptimas para usarlas en Ingeniería tisular deben ser fáciles de obtener y de expandir, deben conservar el fenotipo, mantener su función y ser multipotenciales para diferenciarse o transdiferenciarse a una variedad de células especializadas, específicas de tejidos u órganos, y no deben generar respuestas inmune [24]. Cuando se piensa en las fuentes celulares como paso inicial en el ensamblaje de los constructos, la primera alternativa es el uso de células diferenciadas específicas al tejido, por ejemplo, osteoblastos, cardiomiocitos, que son células ya diferenciadas en su forma final. los osteoblastos sintetizan la matriz extracelular (MEC) calcificada que constituye la base de los huesos y han sido utilizados en numerosas aplicaciones y estudios relacionados con la formación de tejido óseo. No obstante, estas células son altamente diferenciadas y senescentes, lo que se traduce en una baja tasa de proliferación y rápida muerte celular programada, luego de depositar una cierta cantidad de MEC [25]. En consecuencia, es difícil conseguir, a través de cultivos *in vitro*, un número de osteoblastos suficiente para el desarrollo de tejido de novo.

Hay un gran interés por las células troncales, que se pueden replicar como células indiferenciadas que tienen la capacidad de diferenciarse en distintos linajes de tejidos; en este sentido, las células troncales mesenquimales (MSC por sus siglas en inglés), que muestran un fenotipo estable y permanecen en monocapa, han sido utilizadas con mayor frecuencia en ingeniería tisular ósea (ITO), tendón, cartílago y músculo, obteniéndose a partir de tejido adiposo o médula ósea [17, 26].

Para tratar lesiones óseas de tamaño crítico, se necesita una fuente alternativa de células que permitan su aislamiento y expansión en el laboratorio, que no sean inmunogénicas y se obtengan en grandes cantidades. Las células troncales mesenquimales son células pluripotenciales adultas, con morfología fibroblastoide y plasticidad hacia diversos linajes celulares como condrocitos, osteoblastos, adipocitos, miocitos entre otros. Estas células pueden ser aisladas principalmente de médula ósea, sangre de cordón umbilical y tejido adiposo, donde se han logrado establecer cultivos que han permitido estudiar sus propiedades funcionales y fenotípicas [27]. Para la regeneración de tejido óseo, la fuente de obtención de células más estudiada han sido las células troncales humanas de médula ósea o human bone marrow stem cells (hBMSCs por sus siglas en inglés), debido a que en su estroma se encuentran MSCs capaces de diferenciarse y formar hueso [28, 29]. Sin embargo, existen algunos aspectos de que dificultan su uso como; dolor posoperatorio del paciente, es decir después de que pasa el efecto de la anestesia; riesgo de infección o daño a los nervios de la zona, provocando una parestesia. una limitada tasa de proliferación, así como la disminución de la capacidad de diferenciación de acuerdo a la edad del donante de la médula, además que el volumen del aspirado de la médula debe ser mínimo de 150 ml, por lo que la técnica puede influir en el número de células aisladas [27]. No obstante, se destaca que las hBMSC mantienen su potencial de osteodiferenciación en individuos mayores y, que en las condiciones apropiadas *in vitro* (medios de cultivo suplementado con factores de crecimiento) pueden mantener su potencial de diferenciación [29].

Hay otras fuentes, por ejemplo las MSCs a partir de tejido adiposo descubiertas recientemente, parecen tener un buen potencial de diferenciación a osteoblastos [30]. Los

volúmenes de los lipoaspirados pueden ir desde 100 ml hasta varios litros, conteniendo una frecuencia relativamente alta de MSCs entre 1% y 5%. El potencial de diferenciación depende del manejo de cultivo y de los sitios de obtención de la muestra (abdomen, brazos, glúteos, etc.) [31, 32]. Otra fuente de MSCs es a partir de la sangre del cordón umbilical; sin embargo, se afirma que es un procedimiento que requiere todavía la optimización de puntos críticos para lograr un cultivo exitoso, tales como: el tiempo de recolección y el tiempo de procesamiento que debe ser inferior a 16 h, así como el volumen de sangre recolectado, el cual debe ser igual o superior a 30 ml [33].

1.6 La pulpa dental y células troncales de pulpa dental (hDPSCs)

La pulpa dental es un tejido conjuntivo laxo compuesto de células, fibras de colágena reticulares, vasos sanguíneos y nervios que forma parte de la anatomía dental (Ver Figura 1.2 a). Entre las funciones de la pulpa destaca la formativa, que se caracteriza por la formación de dentina primaria y secundaria por los odontoblastos en la capa externa del tejido pulpar. Otra función no menos importante, es nutrir a la dentina por medio de los vasos sanguíneos ubicados bajo las células odontoblásticas [34]. La Figura 1.2 b muestra una histología representativa de un tejido dental, donde se observa la ubicación de la pulpa dental.

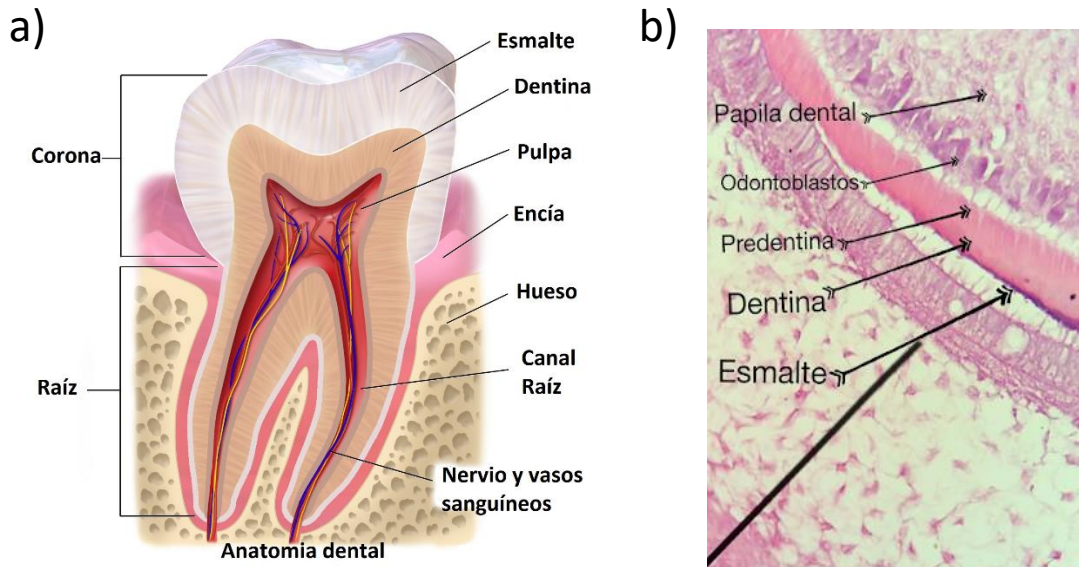


Figura 1.2 a) Anatomía dental, donde se observa la ubicación del tejido de la pulpa; b) detalle histológico de una muestra dental.

En la Figura 1.3 Se pueden diferenciar 4 zonas en la pulpa dental [35]. La zona odontoblástica, donde se encuentran las células de Höhl ó preodontoblastos. La zona oligocelular o zona basal de Weil, esta zona es pobre en células y rica en colágeno, mientras que la zona celular es una zona muy rica en células adyacente a la capa anterior y la zona central, es en esta zona donde se encuentran los odontoblastos, donde están presentes los nervios y vasos sanguíneos [34, 35]

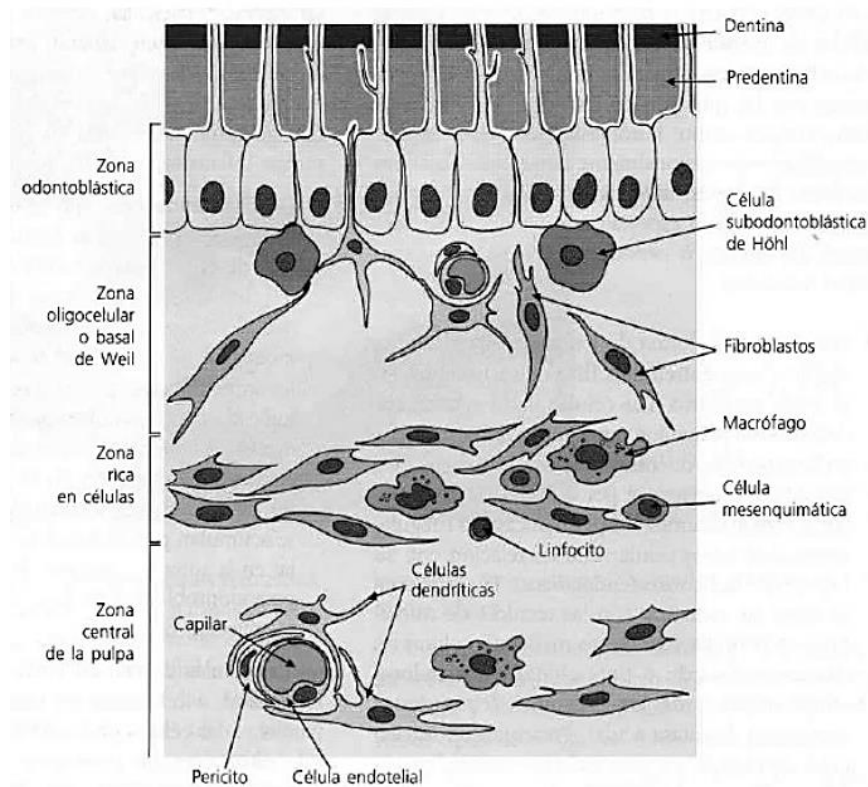


Figura 1.3 Pulpa dental donde se pueden diferenciar las 4 zonas celulares [35].

La Figura 1.4 muestra diferentes subpoblaciones de MSCs dentales, según su tejido de origen. Diogenes *et al*, y Nagata *et al*, lograron identificar 12 sitios potenciales de obtención de MSCs intraorales y dentales, entre los que destacan ocho, donde es posible encontrar estas células. Entre éstas se pueden mencionar las siguientes (de acuerdo a sus siglas en inglés) [36]:

SHED: Células troncales humanas de dientes primarios exfoliados.

PDLSCs: Células troncales humanas del ligamento periodontal.

SCAPs: Células troncales humanas de la papila apical.

DFPCs: Células troncales humanas del folículo dental.

DPSCs: Células troncales humanas de la pulpa dental.

ABMSCs: Células troncales humanas de la médula ósea de huesos orofaciales (maxilar y mandíbula).

GMSCs: Células troncales gingivales mesenquimales.

TGPCs: Células troncales del germen de diente permanente.

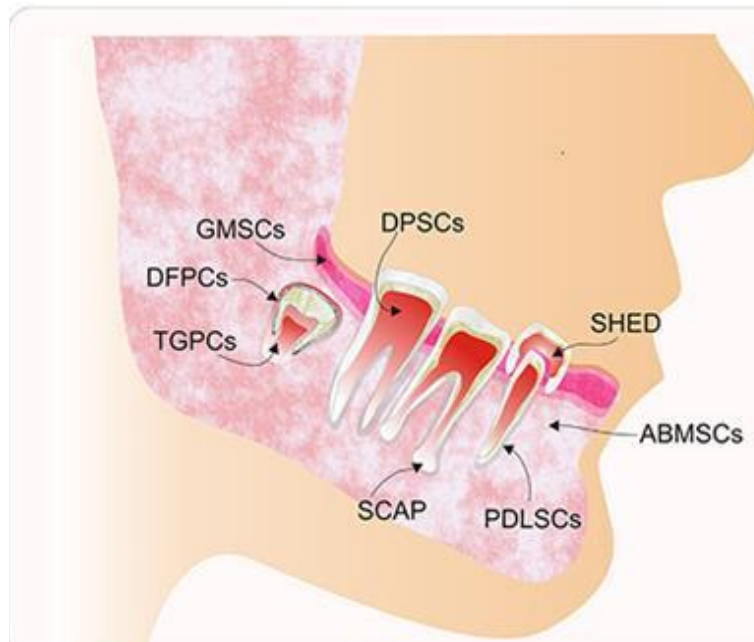


Figura 1.4 Dibujo esquemático de los potenciales sitios de obtención de células troncales postnatales en la cavidad oral [37].

Las DPSCs humanas (hDPSCs) tienen un gran potencial en la ingeniería tisular debido a su baja morbilidad después de la recolección, fácil acceso quirúrgico (ya sea por razones de salud o estéticas) capacidad de ser criopreservadas garantizando un recurso terapéutico a futuro, capacidad de recombinarse con muchos andamios y de privilegio inmunológico y antiinflamatorio, además tasa de proliferación rápida en comparación de células diferenciadas [38-40]. Pueden obtenerse de dientes temporales, terceros molares o dientes adultos sanos [41, 42]. Las hDPSCs se pueden recolectar fácilmente en grandes cantidades a partir de dientes extraídos durante la cirugía dental. Además, cuando se extrae la pulpa,

pacientes experimenten poco dolor y, por lo tanto, es un procedimiento muy común, seguro y efectivo.

La Figura 1.5 muestra un diagrama referente a la capacidad de diferenciación que poseen las hDPSCs en múltiples linajes [43]. En primera instancia, las hDPSCs tienen una morfología similar a la de los fibroblastos y, luego de recibir el estímulo apropiado, las hDPSCs pueden tener diferenciación terminal en células neuronales, condrocitos, adipocitos, miocitos, hepatocitos, células endoteliales y, células similares a odontoblastos, que son formadoras del complejo dentina pulpar [43-45]. Además, se ha reportado que las hDPSC pueden diferenciarse en osteoblastos y, por lo tanto, tienen un gran potencial para la ingeniería del tejido óseo [46-51].

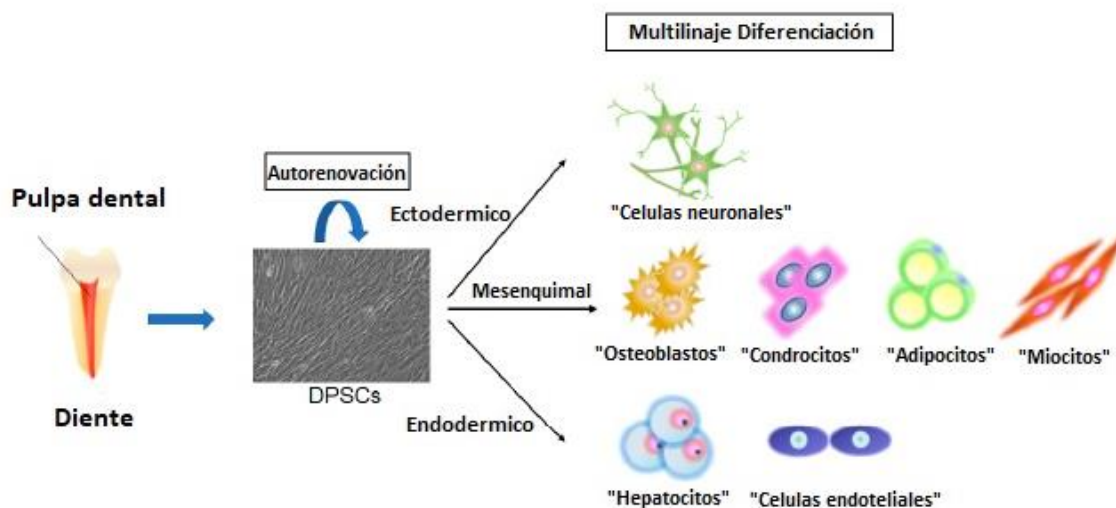


Figura 1.5 Las hDPSC y su diferenciación a diferentes multilíneas ectodérmico, mesenquimal y endodérmico.

1.6.2 Aislamiento y cultivo de las hDPSCs

Las hDPSCs se han obtenido por métodos basados en diversos experimentos e investigaciones, por ejemplo, el reportado por Raouf *et al*, en el año 2014. El aislamiento y cultivo de las hDPSCs se hizo mediante dos metodologías; en la primera, se realizó mediante la técnica de digestión enzimática con colagenasa y dispasa, sembrando células aisladas en placas de cultivo. La segunda metodología fue el método de explante, donde el tejido pulpar

se cortó en pequeños trozos de tejido sin digerir y, se colocó directamente en las placas de Petri. En ambos métodos, se reportó que las hDPSCs crecieron en un medio de cultivo (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB), a 37°C, con 5% de CO₂ y 90% de humedad en la incubadora de CO₂.

1.6.3 Células troncales mesenquimales y fenotipo mesenquimal de la población de la pulpa dental (hDPSCs).

Las células troncales mesenquimales humanas deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condición estándar de cultivo [52], aunque también se ha reportado la diferenciación de células troncales de tejido adiposo a linajes neurogénicos y miogénicos [53, 54]. Además de los antígenos propuestos por ISCT, otros autores proponen moléculas como STRO-1, CD44, y CD166 principalmente, además de CD140B, D1K1, CD146, SSEA-4, CD90.2 (Thy1.2), colágeno tipo I, II, IV, V, Agrecan, Byglican, Decorin, (componentes de la matriz extracelular) Cbfa-1 también conocido como RUNX2 (Factor de transcripción) y Bapx-1 (Receptor transcripcional), VCAM, ICAM, L-selectina (moléculas de adhesión), y la secreción de citosinas como MCP-1, VEGF-A IL-6, IL-8 y ENA-78 para la tipificación de células mesénquimales [52, 55].

Generalmente el análisis fenotípico de las hDPSCs se lleva a cabo mediante el estudio de la expresión de marcadores que son moléculas de superficie celular, características de estas poblaciones celulares. En el caso de las hDPSCs, estos análisis son útiles para la clasificación, el aislamiento, así como para dar seguimiento de sus estados en procesos de diferenciación, los cuales pueden ser visualizados por diversos métodos como citometría de flujo y por inmunofluorescencia. En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (SCT, por sus siglas en inglés) definió las propiedades que debe cumplir una célula para ser considerada como troncal [56]; una de ellas es el presentar marcadores de superficie como el CD73 (5'-ectonucleotidasa), CD90 (glicoproteína anclada en glicosilfosfatidilinositol y CD105 (endoglina), así como ausencia de antígenos hematopoyéticos $\leq 2\%$ como el CD34 (glicoproteína involucrada en la adhesión célula-célula la cual se expresa tempranamente en células de origen hematopoyético), CD45 (glicoproteína transmembrana con actividad

tirosina quinasa, expresado en la superficie de células hematopoyéticas), marcadores de monocitos, macrófagos y linfocitos B [35].

1.7 Polímeros utilizados en ingeniería tisular

Los polímeros biodegradable son los empleados principalmente en la ingeniería tisular ósea, y su uso y popularidad se ha incrementado con el tiempo [57]. Los polímeros sintéticos como el polimetilmetacrilato, polietileno (PE), policaprolactona (PCL), poliuretano y poliácidos, como el poliláctico (PLA) y poliglicólico (PGA) así como sus copolímeros (PLGA) constituyen otra fuente de biomateriales usados para reemplazo o fijación de huesos y rellenos óseos, siendo algunos de ellos biodegradables; Los polímeros sintéticos en general tienen la ventaja de tener tasas de degradación tolerables para el cuerpo humano, mayor previsibilidad de sus propiedades y pueden tener una mejor reproducibilidad de lote a lote; además sirven de soporte al crecimiento celular. Estos materiales no producen toxicidad, son biocompatibles, se degradan por hidrólisis y están aprobados por la FDA (Administración de drogas y fármacos) [58]. También se han utilizado los polímeros naturales tales como colágeno, quitosano, ácido hialurónico tiene un bajo potencial inmunogénico, con un potencial bioactivo que es capaz de interactuar con el tejido del huésped [13].

1.7.1 Poli (glicerol sebacato) (PGS)

El PGS es un polímero elastómero, biodegradable y biocompatible, obtenido por policondensación del ácido sebácico con el glicerol (Ver Figura 1.6). El ácido sebácico es un metabolito, intermediario natural de la ω -oxidación de ácidos grasos de cadena larga, y el glicerol es uno de los componentes principales de los lípidos. Ambos monómeros están aprobados por la FDA y tienen la ventaja de tener un bajo costo económico [59]. Además, para el proceso de síntesis del polímero no se necesita ningún tipo de aditivo o catalizador para el inicio de la reacción y, los productos de la degradación, se encuentran de forma natural en el organismo, son reabsorbidos con facilidad, lo que reduce el riesgo de efectos tóxicos indeseados [60].

En un estudio realizado por Wang *et al* en el 2002, determinó que el proceso de síntesis del PGS comprende dos etapas[61]: la fase de prepolimerización, que da lugar a un prepolimero (pPGS) viscoso, debido a la formación de cadenas lineales entre los monómeros reaccionantes, y una segunda etapa de entrecruzado, en la que las cadenas se entrecruzan para formar la red polimérica. La prepolimerización se puede llevar a cabo haciendo reaccionar los monómeros a una temperatura entre 110°C y 150°C durante 24 horas, manteniendo una atmósfera inerte normalmente con nitrógeno o argón a una presión reducida entre 1 mmHg y 20 mmHg. Para el proceso de entrecruzamiento, se calienta entre 110°C y 150°C a una presión de vacío de 75 mmHg al menos durante 12 horas, en esta etapa, a diferencia de la primera, no se requiere una atmósfera inerte. En general, la formación del polímero final se puede describir mediante un proceso de esterificación. Son los grupos hidroxilo del glicerol los que actúan como iniciadores de la reacción; así, inicialmente, un grupo hidroxilo primario ataca a un grupo carboxílico para formar un monoéster con un grupo carboxílico libre. Este monoéster reaccionará con otro grupo primario del glicerol, y posteriormente se separará, formando el monoéster y agua como subproducto. Este proceso ocurre de manera sucesiva con todos los grupos funcionales [62].

Las propiedades del PGS indican que es un material flexible, con la posibilidad de una gran deformación reversible, con una recuperación casi completa en ambientes dinámico-mecánicos. Esto lo hace adecuado para ser utilizado en contornos difíciles del cuerpo, en los cuales, los polímeros frágiles y duros no pueden emplearse. Su curva de esfuerzo - deformación es similar a la del hule natural y su naturaleza elastomérica es debida a su entrecruzamiento covalente, y a que es una red tridimensional de espirales al azar con grupos hidroxilo unidos a su matriz. Al ser un material entrecruzado, el pPGS es soluble en una gran cantidad de disolventes orgánicos, pero el polímero final es insoluble. Además, puede degradarse y ser absorbido, y sus productos de degradación son eliminados por vías naturales. Estudios han mostrado el uso del poliglicerol sebacato (PGS) como una matriz que induce la formación de nuevo tejido [59, 61, 63-66].

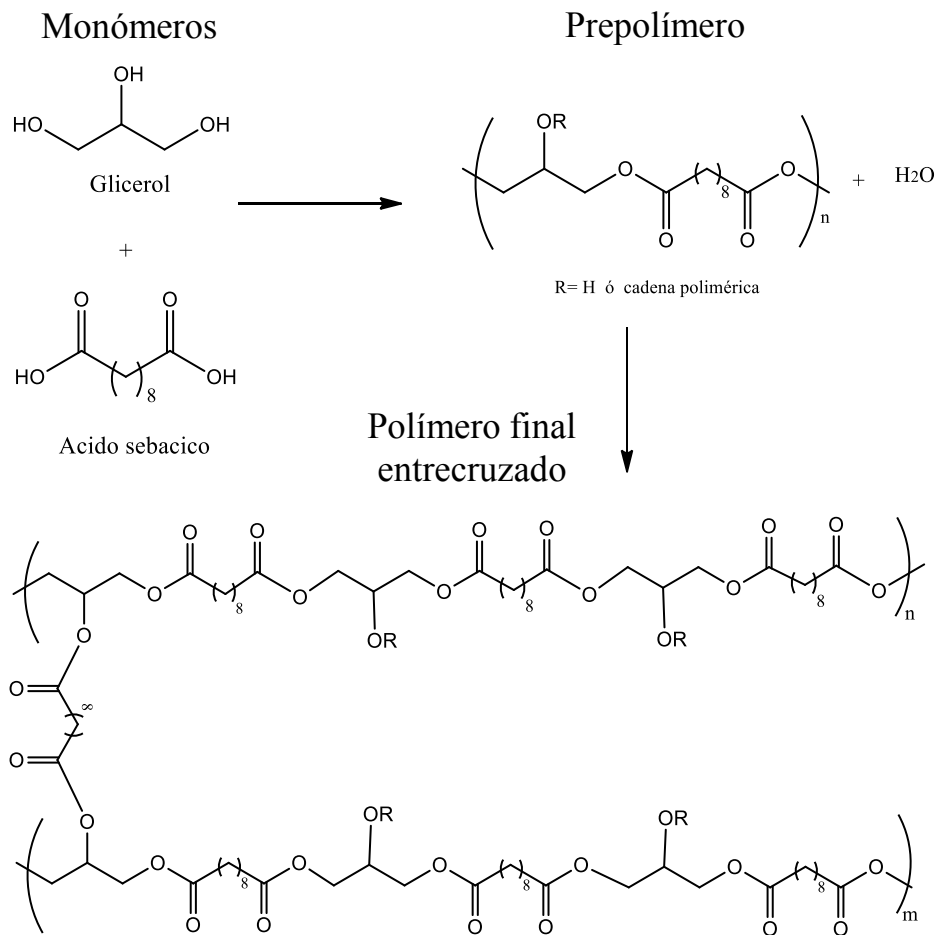


Figura 1.6 Procesos de obtención del pPGS y el polímero final entrecruzado PGS [61].

Con respecto a las propiedades mecánicas del PGS, Rai *et al.* en 2012, reportó valores del módulo de Young del PGS en un intervalo entre 25 kPa y 1,200 kPa. Estos valores se encuentran entre el módulo de elasticidad de los ligamentos y el del miocardio, siendo muy parecido al del nervio periférico con valor de 450 kPa, y su elongación máxima de 260%, es similar al de las venas y las arterias [67]. Las propiedades mecánicas y su cinética de degradación del PGS pueden ser controladas por la variación en la concentración de reactivos durante la etapa de prepolimerización, así como por el tiempo y la temperatura de entrecruzamiento. Su mecanismo de degradación se da por la desaparición de los enlaces

éster, con una pérdida lineal de la masa y de su resistencia, lo cual contribuye a que no se hinche [68]. Además, esto permite que el polímero conserve en gran medida su integridad estructural y por lo tanto sus propiedades mecánicas. En la Tabla 1.1 se muestran los diferentes intervalos para el módulo elástico de películas de PGS entrecruzado, reportadas por varios autores.

Tabla 1.1 Diferentes propiedades mecánicas del PGS reportadas

Módulo elástico (MPa)	Elongación máxima (%)	Esfuerzo máximo (MPa)	Referencia
0.024	40.0	0.69	Patel <i>et al</i> [59]. 2011
0.06-1.20	40.0-260	0.23-0.47	Chen <i>et al</i> [69]. 2008
0.17-0.64	109-526	0.37-0.41	Sundback <i>et al</i> [70]. 2012
0.40-2.40	15.0-100	0.21-0.54	A.G. Mitsaka <i>et al</i> [71] 2011

Wang *et al.* en 2003, reportó que, al implantar una película de PGS, su vida media de degradación fue de 21 días y, al día 60 se observó una absorción completa. Asimismo, se reportó que su absorción de agua durante la degradación es mínima sin hinchamiento detectable.

Por otro lado, estudios térmicos realizados al PGS han revelado que es un polímero semicristalino, completamente amorfo por encima de 37 °C. Los picos amplios típicos de los polímeros amorfos se observan en estudios de difracción de rayos X (DRX) del PGS [69]. Jaafer *et al.*, demostró mediante calorimetría diferencial de barrido que el grado de cristalización de PGS disminuye significativamente con el incremento del tiempo de entrecruzamiento y la temperatura; los termogramas mostraron el estrechamiento de la región de transición, la reducción en la magnitud del pico de fusión y un cambio general hacia temperaturas más bajas, a medida que aumentan la temperatura y el tiempo de curado [72]. La síntesis de PGS implica la consideración de cinco criterios, de acuerdo a la aplicación prevista que se desea: 1) Debe degradarse preferentemente por vía hidrolítica, para reducir la variación en la cinética de degradación causada por degradación enzimática. 2) Los enlaces

éster favorecen la degradación hidrolítica. 3) Se necesita un bajo grado de entrecruzamiento entre las cadenas poliméricas que lo conforman. 4) Los enlaces químicos entrecruzados necesitan ser hidrolizables e idénticos a los de la cadena principal para reducir la posibilidad de degradación heterogénea. 5) Los reactivos no deben ser tóxicos, al menos uno debe ser trifuncional y al menos uno debe proporcionar grupos hidroxilo para la formación de puentes de hidrógeno [61].

Las aplicaciones biomédicas del PGS se han enfocado principalmente en el remplazo de músculo cardíaco [73] válvulas cardíacas [74] injertos vasculares [75], cartílago [76], nervio periférico [63], trasplante de retina [77], etc; Sin embargo, las aplicaciones de éste se han ido expandiendo hacia la liberación controlada de fármacos, como adhesivo tisular y para la regeneración de tejidos duros [67]. Chen *et al.*, 2008, mostró que un ejemplo de aplicación sería un parche de PGS para el corazón, el cual debe ser biocompatible, degradable y elástico [69]. Kemppainen *et al*, en el 2010, reportó que andamios de PGS presentaron valores de módulos que se encuentren en los rangos del que presenta el cartílago articular del cuerpo humano [78]. Sundback *et al*, 2005, reportó el efecto de films (láminas) de PGS en la actividad metabólica, fijación, proliferación y apoptosis de las células de Schwann *in vitro* [63]. Ghosh *et al*, 2011, reportó una aplicación del PGS que consiste en la creación de una membrana de éste para conseguir la eliminación selectiva de fotorreceptores, ya que algunas de estas células de retina que se encuentren enfermas podrían obstruir el desarrollo de contactos neuronales que son necesarios para la visión [79]. Chen *et al*, 2010, demostró que las películas de PGS son capaces de soportar las contracciones que producen los latidos de cardiomiocitos derivado de células troncales mesenquimales durante 3 meses sin ninguna interrupción [73]. Además, no se observaron diferencias significativas con la frecuencia de contracciones con respecto al medio de cultivo estático (cardiomiocitos sin ningún material de soporte). Por lo tanto, el PGS es un material capaz de adherir cardiomiocitos, soportar las contracciones que inducen durante la manipulación quirúrgica, así como permitir el desprendimiento de las células una vez implantado.

Por otro lado, aunque numerosas estrategias que se usan actualmente para regenerar hueso dependen del empleo de materiales biocompatibles que exhiban una estructura de andamio. Se ha investigado una variedad de materiales que involucran el PGS como andamios para la ingeniería tisular ósea que es la aplicación donde más se utilizan células troncales de pulpa dental hDPSCs. En la Tabla 1.2 se presenta un listado de algunos estudios realizados con andamios a base de PGS aplicados a la ingeniería tisular para regeneración ósea utilizando células troncales, y de algunos poliésteres donde se han cultivado hDPSCs para aplicaciones de regeneración de tejido óseo.

Tabla 1. 2 Estudio de biocompatibilidad *in vitro*

Material	Fuente de células	Principales resultados	Ref
PGS/vidrio bioactivo	Médula ósea de rata (rBMSCs)	Los estudios <i>in vitro</i> indicaron que el recubrimiento de PGS promovió la adherencia y proliferación celular de una manera dependiente de la concentración de PGS, sin afectar la capacidad de inducción osteogénica del sustrato.	[80]
PGS	rBMSC.	Este estudio confirmó que el PGS es osteoconductor y contribuye a la regeneración ósea al reclutar poblaciones de células rBMSC. Se determinó que la transmisión de carga mecánica influye en la estructura, masa ósea y promueve la diferenciación y la maduración de la matriz hacia la remodelación ósea.	[81]
PGS/ β -TCP	Precursor de osteoblastos MC3T3-E1	Se investigaron propiedades osteogénicas de los andamios de PGS en combinación con inductores osteogénicos BMP-2 y TGF- β 1. Los andamios mostraron propiedades mecánicas y biológicas mejoradas y tienen potencial de ser utilizadas en aplicaciones en la interface de tejido blando-óseo.	[82]
PGS/ β -TCP	rBMSC	Los andamios β -TCP/PGS permitieron la migración y proliferación celular, lo que indica una buena biocompatibilidad. Además, éstos incrementaron la mineralización con un incremento de las partículas de calcio y potasio . se demostró que los andamios β -TCP/PGS tienen una gran aplicación potencial en la regeneración de tejidos rígidos.	[83]

PGS/HA	rBMSCs	Se estudio el PGS en combinación con partículas de hidroxapatita (HA). Los resultados de este estudio sugieren que el elastómero PGS es un material osteoconductor propicio para la regeneración de defectos óseos.	[84]
PGS	Preosteoblastos MC3T3-E1	Las células MC3T3-E1 proliferaron en el PGS, sintetizaron matriz de colágeno y expresaron marcadores osteogénicos RUNX ₂ , sialoproteína ósea y osteocalcina de acuerdo con su densidad de cultivo celular. Se llegó a la conclusión de que el PGS promueve el fenotipo osteoblástico <i>in vitro</i> con propiedades osteoconductoras, las cuales son prometedoras para la regeneración ósea	[85]
(PLLA-co-PGA-co-PCL) (PLGC)	hDPSCs	Las hDPSCs, en presencia del andamio y factores osteogénicos (OF), mostraron fenotipo de osteoblastos diferenciados. El andamio se diseñó y fabricó mediante técnicas computarizadas utilizando poliésteres biodegradables (PLLA-co-PGA-co-PCL) (PLGC). Se confirmó la formación de tejido óseo dentro de un defecto de hueso craneal usando hDPSCs y un andamio PLGC diseñado por impresión 3D.	[40]
PLGA/HA	hDPSCs	La capacidad de diferenciación de hDPSCs hacia el linaje de osteoblastos fue mejor en el andamio de PLGA/HA a los 7, 15 y 30 días en comparación del PLGA sin HA. Esto se verificó con el incremento de la expresión de marcadores osteogénicos RUNX ₂ , ALP, OPN y COL-I.	[86]
PGS/PLA	rBMSCs	Los andamios PGS/PLA exhibieron elevada mineralización, alta biocompatibilidad celular, adherencia celular mejorada y diferenciación	[65]

osteogénica de rBMSCs, especialmente cuando los andamios PGS/PLA son tratados con plasma de aire.

1.8 Técnicas de fabricación de andamios

A diferencia de otros biopolímeros, incluidos los polímeros naturales y sintéticos, el PGS presenta un conjunto de limitaciones y varios desafíos en la fabricación de andamios tridimensionales; esto se debe a las elevadas condiciones de temperatura para el entrecruzamiento de PGS, que incluyen altas temperaturas, largos tiempos y un entorno de vacío [87]. A pesar de lo anterior, se han utilizado o desarrollado varios métodos de procesamiento para diseñar andamios PGS en las que se incluyen:

1.8.1 Electrohilamiento.

La técnica consiste en someter soluciones de polímero a altos campos eléctricos, que superen las fuerzas de la tensión superficial de la solución de polímero cargado. De esta forma, a un voltaje determinado, finos chorros de solución son expulsados desde el capilar hasta el plato colector; el disolvente se evapora y fibras poliméricas son depositados al azar en un sustrato [88]. La filosofía de esta técnica es que la obtención de una topografía fibrosa, similar a la estructura de la matriz extracelular (ECM), es beneficiosa para la proliferación y migración de las células. La fabricación de andamios de PGS por la técnica de electrohilamiento puede mejorar la resistencia a tensión y su manipulación quirúrgica; sin embargo, obtener andamios por electrohilamiento de PGS entrecruzado es un reto, debido a que el pPGS por sí solo no es posible electrohilar, debido a su bajo peso molecular [89]. Existen reportes donde el pPGS, en conjunto con un polímero portador, es mezclado y electrohilado coaxialmente. Por ejemplo, Sant, en el 2011, utilizaron PCL como polímero portador obteniendo fibras con un diámetro promedio de 2 μm [90]. Sin embargo, debido a que el punto de fusión de la PCL es 60°C, la posibilidad de mantener la morfología fibrosa se ve comprometida después del entrecruzamiento térmico del pPGS. Adicionalmente, la fracción soluble del PGS que no es entrecruzado puede tener un efecto citotóxico si no se elimina por completo del andamio [90] [91]. Aunado a esto, la transición de fase de un estado sólido pastoso del pPGS a un estado de líquido viscoso durante el entrecruzamiento puede afectar a la morfología final de las fibras. El pPGS tiene una temperatura de transición vítrea (T_g) por debajo de la temperatura ambiente haciendo que el pPGS fluya y las fibras puedan llegar a consolidarse en una película

no porosa; además esta fusión se ve incrementada por las altas temperaturas necesarias para el entrecruzamiento térmico.

Ravichandran *et al*, fabricaron nanofibras núcleo coraza mediante electrohilado coaxial, con pPGS como material del núcleo y poli (ácido láctico) (PLLA) como material de coraza. El PLLA se eliminó con una mezcla de diclorometano/hexano en proporción 2/1 v/v para obtener fibras de PGS. Los resultados mostraron que las proteínas marcadoras cardíacas: actina, troponina, cadena pesada de miosina y conexina 43 se expresaron más en las nanofibras de PGS en comparación con las nanofibras de PLLA[92]. Sin embargo, este procedimiento tiene el inconveniente de bajas tasas de generación de fibras, y la dificultad de producir andamios con grandes espesores. Existen otros reportes donde utilizan gelatina como polímero portador, pero se requieren métodos de entrecruzamiento, en los cuales se utiliza glutaraldehído [93] o radiación UV [94]. Esto puede modificar la estructura y las propiedades del PGS, desencadenando inflamación cuando éste sea implantado [94-96]. Estas técnicas mezclan el pPGS con un polímero portador que forme fácilmente fibras. Sin embargo, si el polímero portador no se elimina o si el pPGS se entrecruza, las propiedades fisicoquímicas del andamio serán sustancialmente del PGS entrecruzado. Por lo que el reto es desarrollar un método simple y de bajo costo para poder fabricar andamios de PGS entrecruzado, con estructura nanofibrosa, utilizando para esto la técnica de electrohilamiento. Además, el PSG debe estar entrecruzado, sin el uso de entrecruzantes tóxicos y, no se deben utilizar disolventes orgánicos fuertes para eliminar el polímero portador.

1.8.2 Lixiviación de partículas

La técnica consiste en realizar una disolución polimérica, en la cual se dispersan partículas tamizadas (por ejemplo, sal), que son solubles en un disolvente. Posteriormente, la solución se coloca en un molde y el disolvente es extraído con ayuda de vacío. Las partículas son disueltas sin disolver el polímero, obteniendo así un sólido poroso que es el andamio; finalmente, el andamio es secado a vacío. La lixiviación de partículas es un método atractivo para crear andamios porosos debido a su simplicidad. Estos métodos se han aplicado con éxito para fabricar andamios con poros interconectados bien definidos utilizando polímeros

termoplásticos, como la poli(láctico-co-glicólico)(PLG) [71] y PCL/PLGA [97]. En esta técnica, la porosidad y el tamaño de poro de los andamios de PGS puede ser controlado modificando la cantidad y tamaño de partículas de NaCl, mejorando de esta manera la viabilidad celular en comparación de películas densas de PGS [60, 65]. La temperatura y tiempo de curado también son parámetros que influyen en la morfología de los andamios de PGS [98].

Por otro lado, el módulo elástico del andamio disminuye linealmente con el incremento de la cantidad de porógeno utilizado para la fabricación de los andamios. La relación entre el número y el tamaño de las partículas, es igual a la relación de área superficial vs volumen del andamio [99].

1.8.3 Solidificación/liofilización

La liofilización es conocida como un proceso que se basa en la congelación de un producto con fines de conservación. El producto congelado se pasa a una cámara de vacío donde se produce una extracción del agua, esto para eliminar los agentes que descomponen el producto; este procedimiento se realiza generalmente con emulsiones. Primero se obtiene una emulsión a partir de una solución polimérica. Posteriormente, esta mezcla es colocada en un molde y se solidifica mediante el decremento de la temperatura; en ocasiones el proceso de solidificación de la suspensión se realiza sumergiendo el molde en nitrógeno líquido. Finalmente, se realiza el proceso de liofilización, el cual consiste en extraer la fase dispersante, que comúnmente es una fase acuosa, y el disolvente de la solución polimérica, mediante sublimación. Con esta técnica se pueden obtener andamios hasta con el 90% de porosidad, con poros interconectados y con tamaños de poro de 15 a 35 μm . Se han reportado la fabricación de andamios de PGS en combinación con un biopolímero como el poli (ácido L-láctico) (PLLA) que de soporte estructural al PGS mediante la técnica de liofilización. Lo que permitió un enfoque versátil de fabricación de andamios basados en PGS con poros grandes e interconectados para la ingeniería tisular [87].

1.9 Modificación superficial del PGS

El PGS ha mostrado buena biocompatibilidad debido a sus grupos OH [63]. Sin embargo, el incremento del grado de entrecruzamiento necesario para la fabricación de andamios, disminuyen estos grupos funcionales, lo que promueve una baja adhesión celular. Debido a esto, los andamios de PGS deben ser modificados para promover un balance entre la biocompatibilidad y sus propiedades mecánicas. Así, se han empleado varias técnicas de modificación de superficie para mejorar las propiedades de superficie de los andamios PGS, como la inmovilización con un agente bioactivo o secuencias de péptidos [100], el recubrimiento con macromoléculas de ECM [101], la copolimerización con polímeros hidrofílicos [59], hidrólisis alcalina y el tratamiento de acidificación de los andamios de PGS mejoran la interacción homogénea de péptidos con las superficies de los materiales en base a PGS [98].

1.9.1 Modificación superficial por plasma con monómero bioactivos.

Un plasma es un gas compuesto de un número casi igual de iones positivos y negativos. La ionización de los átomos se inicia por las continuas colisiones entre los átomos que eventualmente desprenden electrones, los cuales también participan activamente en las siguientes colisiones incrementando así el número de iones y electrones en el gas de inicio [102]. El tratamiento con plasma tiene un enfoque económico que no solo aumenta la hidrofiliidad superficial y la rugosidad de un polímero tratado, sino que genera grupos funcionales adicionales como: aminas, carbonilos, hidroxilos y grupos carboxilo que mejoran la interacción entre moléculas poliméricas y los sistemas biológicos. Entre las principales ventajas de la técnica de polimerización por plasma es que se puede modificar la superficie de casi cualquier material [103]. Se ha reportado que el tratamiento con plasma de aire de andamios de PGS promueve la infiltración de condrocitos humanos [104], así como la proliferación osteogénesis y diferenciación de rBMSCs [65].-Este tipo de tratamientos mejora la biocompatibilidad de los biomateriales sin sufrir cambios en sus propiedades de masa y volumen.

La promoción de la adhesión y proliferación celular de la superficie también se puede lograr injertando en el andamio, mediante la polimerización por plasma, un monómero que produzca una superficie bioactiva, sin el riesgo de contaminación con reactivos catalíticos que puedan causar un aumento en la respuesta de inflamación y degeneración [105]. En la polimerización por plasma, las continuas reacciones son llevadas a cabo mediante un campo eléctrico que promueve una colisión continua entre monómeros, los cuales se van uniendo poco a poco, acelerados por un potencial eléctrico, donde participan los monómeros de partida y en los siguientes pasos generando productos como oligómeros y polímeros con diferente peso molecular.

En la familia de los polipirroles, los sintetizados por plasma son complejas estructuras de red de aminas -NH- originadas por colisiones de las moléculas de pirrol con partículas del plasma. Como efecto de las colisiones, los anillos de pirrol se deshidrogenan parcialmente formando fragmentos y/o radicales que para neutralizarse forman enlaces dobles y/o estructuras entrecruzadas dando lugar a una infinidad de estructuras entrecruzadas (Ver Figura 1.7). El polipirrol (PPy) altamente entrecruzado en el plasma pierde todos los átomos de hidrógeno, convirtiéndose, en casos extremos, en redes de esqueletos de pirrol (anillos -N-C=C-C=C-). Esta configuración puede generar nanoestructuras esféricas basadas en átomos de C y N [106].

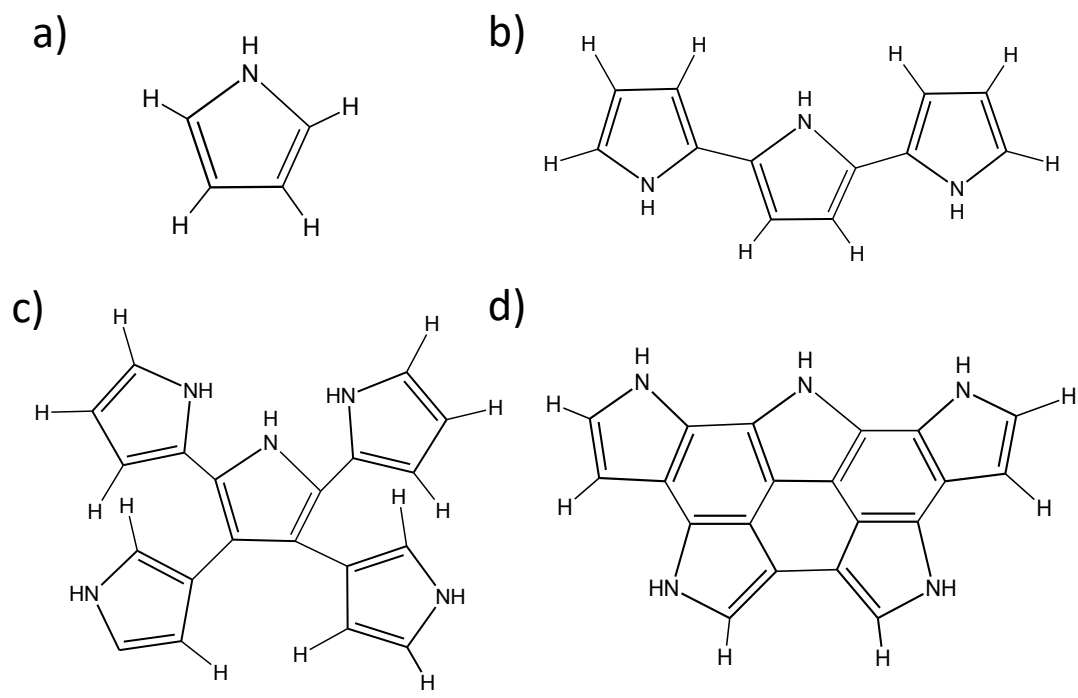


Figura 1. 7 Porcentaje de entrecruzamiento de derivados de PPy bajo la acción del plasma a) monómero de pirrol b) X=33% c) X=40% d) X=70%

La Figura 1.8 muestra el destello de luz característico del plasma.



Figura 1.8 Reactor de plasma (proceso de activación de la superficie); el color azul indica la ionización del gas presente.

Por otro lado, el mecanismo de conducción eléctrica del PPy-I es similar al PPy dopado vía química y electroquímicamente. La forma conductora de PPy implica la oxidación del polímero; así, cargas positivas aparecen en la estructura como resultado de la oxidación de la cadena y estas cargas positivas son compensadas por la incorporación de aniones yoduro para mantener la electroneutralidad [107]. El transporte de cargas eléctricas en el PPy es debido a la estructura electrónica conjugada de anillos de pirrol, que dispuestos en unidades consecutivas producen cadenas largas con segmentos electrónicos conjugados.

El polipirrol yodo (PPy-I) sintetizado por plasma, ha demostrado favorecer la interacción celular [108], la cual ha sido asociada con la diversidad química de su superficie, que confiere adherencia y estimulación celular debido a sus grupos N-H, entre otros, generados durante la síntesis [19, 109, 110]. En congruencia con estos hallazgos, Mejía, L. *et al* [111] y Olayo *et al* [105], encontraron que la administración de mesopartículas de PPy-I en ratas con lesión de la médula espinal, promovió la recuperación motora en combinación con fisioterapia; el PPy-I se integró exitosamente en el tejido nervioso, sin mostrar una respuesta inflamatoria severa. Ambos resultados, demostraron ser favorables *in vivo*. Sin embargo, materiales compuestos exclusivamente de PPy-I no son aceptados como biomateriales; lo anterior se debe a que tiene baja solubilidad, lo que hace difícil su procesamiento en estructuras complejas tridimensionales, por su fragilidad y biodegradabilidad [112, 113].

Para superar estas limitaciones, se ha utilizado PPy-I como injerto en otros polímeros utilizando plasma, por ejemplo, la polivinilpirrolidona (PVP) para el crecimiento de células de piel [114]; andamios de poli(acido láctico) hidroxapatita (PLA/HA) para crecimiento de osteoblastos [115]; andamios de policaprolactona PCL para el soporte de fibroblastos [116]; andamios de PCL/PLA para células de cartílago auricular [110], etc. Estos estudios muestran que las superficies modificadas con PPy-I, en comparación de los andamios no modificados, originan una excelente formación de tejido y mayor viabilidad celular.

La Figura 1.9 muestra la estructura del PPy-I (polipirrol dopado con yodo) sintetizado por plasma, propuesta por Serratos *et al* [19]. Cruz *et al.* en el 2010, reportó dos representaciones de partículas esféricas derivadas del PPy sintetizado por plasma [106]. Los autores revelan que el crecimiento del PPy en forma de esfera, se da como resultado de la unión de esqueletos en forma de hexágonos de pirrol. Los anillos de pirrol producen superficies curvas a medida que se agregan más anillos a la red; el proceso continúa hasta que la superficie forma una esfera.

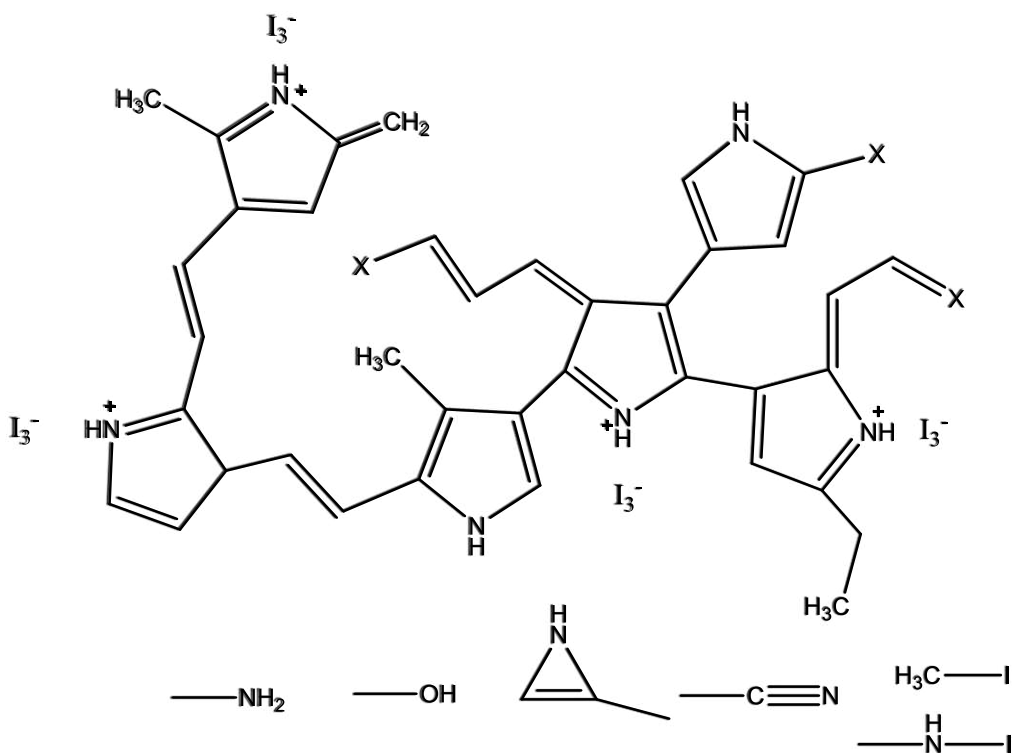


Figura 1. 9 Estructura propuesta por Serratos *et al*; (a) PPy (X puede tomar cualquier forma de grupos propuesta).

El (PPy) es un polímero intrínsecamente conductor utilizado en aplicaciones biomédicas. La síntesis de materiales poliméricos derivados del pirrol, sobre materiales biocompatibles, se ha realizado con frecuencia mediante métodos químicos oxidativos o electroquímicos [117]. Sin embargo, los polímeros obtenidos de esta manera modifican sustancialmente las propiedades mecánicas volviéndolas estructuras rígidas; además, deben purificarse más cuidadosamente antes de aplicarlos a sistemas vivos, ya que las impurezas y la contaminación

con disolventes atrapados y residuos de catalizadores entre las cadenas pueden tener efectos adversos, como un aumento en la respuesta de la inflamación y en la degeneración del tejido.

A diferencia de la síntesis química y electroquímica, la síntesis con plasma tiene la principal ventaja de modificar la superficie sin alterar sustancialmente sus propiedades de masa y volumen. Por otro lado, se ha demostrado que las hDPSC podían adherirse a sustratos modificados con PPy, que presentan características conductoras eléctricas con una tasa de proliferación comparable a las del control positivo[118]. Además, las resistencias más bajas de las películas de PPy dieron como resultado un mayor nivel de mineralización de hDPSC, que estaban de acuerdo con estudios con rBMSC, lo que sugiere que la osteodiferenciación de las hDPSC puede mejorarse mediante la conductividad de los andamios a base de PPy [118, 119].

1.10 Planteamiento del problema

Millones de pacientes en todo el mundo tienen defectos óseos como resultado de traumas, anomalías congénitas, enfermedades deformantes, infecciones o resecciones de tumores. La frecuencia de estas condiciones está ligada al crecimiento continuo de la población mundial, particularmente debido al aumento de la esperanza de vida [120].

En el campo de la regeneración ósea, los tratamientos clínicos actuales han generado resultados pobres relacionados principalmente con la limitada disponibilidad de hueso autólogo, así como también el riesgo de transmisión de enfermedades y de rechazo que producen los aloinjertos y xenoinjertos óseos. Por otra parte, metales como el hierro, cobalto y titanio pueden ser implantados de manera permanente en el hueso para llenar los defectos y brindar fijación interna; sin embargo, la fatiga, corrosión, infección de los tejidos y la pobre interface tejido/implante que se genera produce complicaciones haciendo necesaria su remoción [121].

La ingeniería del tejido óseo (ITO) ha surgido como un enfoque muy prometedor para desarrollar sustitutos óseos biológicamente activos para restaurar, mantener y mejorar el tejido óseo. Esta ciencia involucra el diseño, construcción, modificación, reparación y regeneración de los tejidos vivos utilizando biomateriales, células y factores de crecimiento. En los últimos años, la ITO se ha convertido en una estrategia terapéutica de regeneración tisular mínimamente invasiva, consiste en aislar células obtenidas de pequeñas biopsias de los pacientes y hacerlas crecer sobre constructos tridimensionales *in vitro* para luego implantarlas a la zona deseada y así dirigir la formación del nuevo tejido [4].

El desafío está en desarrollar un andamio polimérico basado en el poli(glicerol sebacato), modificando su superficie con incorporación de partículas provenientes del pirrol mediante modificación por plasma, que pueda brindar la arquitectura, que no sea tóxico y que brinde condiciones necesarias para el crecimiento de células troncales de pulpa dental, todo esto con el entendimiento del efecto que tiene el tiempo de modificación en el plasma en el andamio.

1.11 Justificación

Estudios estiman que el mercado global de los biomateriales poliméricos representó cifras en torno a 89.7 billones de dólares en 2018, frente a los 44 billones del año 2012 [122]. La industria de los biomateriales poliméricos será en un futuro próximo un mercado potencial debido, entre otros motivos, al progresivo envejecimiento de la población con pacientes en edad avanzada con necesidades de reemplazos de tejidos dañados. En las áreas de la ortopedia, traumatología, odontología, cirugía plástica y maxilofacial, son frecuentes los problemas en el sistema esquelético, en los que se involucra la pérdida del tejido ocasionado por enfermedades crónicas degenerativas, traumas, tumores, envejecimiento, pacientes edéntulos, deformidades óseas congénitas, entre otras, razón por la cual las naciones unidas en la década del 2000 al 2010 la denominó “La década de los huesos y las articulaciones”, esto con el propósito de generar conciencia del impacto que desencadenan los problemas óseos en la salud humana y promover la investigación y desarrollo tecnológico en esta área.

En México se está trabajando en el aislamiento de células troncales con el propósito de crear protocolos de diferenciación para la obtención de células especializadas, así como técnicas estandarizadas para la extracción y cultivo de las mismas. Por esto surge la necesidad de implementar estrategias terapéuticas para el manejo de lesiones a nivel del tejido óseo. Una alternativa que se ha planteado desde años atrás es la ingeniería de tejidos, cuyo principio básico es emplear constructos tridimensionales de biomateriales naturales o sintéticos, células madre o células ya diferenciadas y factores de crecimiento, con el objetivo de crear un tejido nuevo *in vitro* para ser posteriormente implantado en el sitio de la lesión [123].

Estudios han mostrado que la modificación de las superficies de andamios con PPy-I favorece la viabilidad celular y la formación de tejido en comparación con los andamios no tratados. Sin embargo, en estos estudios, solo se evaluó un tiempo de exposición de los andamios al plasma. Por tanto, no se conoce la influencia que tiene el tiempo de exposición en la variación de grupos funcionales sobre la viabilidad celular de hDPSCs. Por lo tanto, se propone estudiar el efecto del tiempo de exposición se cumplió con éxito, demostrando la correlación entre el

tiempo de exposición al tratamiento con plasma en las propiedades fisicoquímicas y en las propiedades biológicas de los andamios PGS tratados.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

Glicerol (pureza > 99.5%), ácido sebácico (pureza > 98.5%), etanol absoluto (EtOH) (grado AR, 99.9%), pirrol (pureza > 99.5%), yodo (pureza > 99.5), y cloruro de sodio (NaCl, se utilizó como porógeno) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (EE. UU). El NaCl se tamizó hasta obtener partículas con diámetros en el intervalo de 105 μm a 180 μm . Los reactivos medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), Suero Fetal Bovino (SFB), Buffer Fosfato Salino (PBS), Paraformaldehído (PFA), Fluoromont, CellTiter blue, tripsina, penicilina, estreptomycin, tripsina y anticuerpos para cultivo celular se obtuvieron de Invitrogen (EE. UU).

2.2 Síntesis del andamio

2.2.1 Síntesis del pPGS

El pPGS se sintetizó a partir de reacciones de policondensación con una relación equimolar de glicerol y ácido sebácico en un matraz de tres bocas con agitación magnética, bajo atmósfera de nitrógeno, a 140°C durante 16 h [60, 61, 104, 124]. El producto de la reacción, se postcuró a 140°C bajo una presión de 75 mmHg durante 12 h. El pPGS resultante, se mostró como un líquido viscoso que se almacenó en un desecador.

2.2.2 Preparación de andamios PGS

Los andamios se fabricaron mediante la técnica de lixiviado de partículas de NaCl con diámetros entre 105 μm -180 μm . Las partículas de NaCl y el pPGS, en relaciones de peso 80/20 70/30 y 60/40, se mezclaron vigorosamente usando un agitador mecánico. Las mezclas resultantes se depositaron en moldes redondos de teflón de 1 mm de espesor y se calentaron a 150°C bajo una presión de 150 mmHg durante 12 h, con el fin de entrecruzar el pPGS para formar el PGS [60]. Las partículas de NaCl y residuos químicos fueron extraídos con etanol absoluto durante 6 h, etanol/agua al 70% (v/v) el primer día y al 30 % (v/v) el segundo día, para finalizar con un lavado con agua desionizada al tercer día con cambio completo de agua

cada 6 h. Para eliminar el contenido de agua, los andamios se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fueron liofilizados durante 48 h.

2.3 Caracterización fisicoquímica de los andamios de PGS fabricados por lixiviado

2.3.1 Análisis elemental mediante la energía de rayos X dispersivos (EDX)

La composición química elemental de los andamios 80/20, 70/30 y 60/40 se analizó por medio de un microanálisis dispersión de energía de rayos X dispersivo de energía (EDX), utilizando un espectrómetro de dispersión de energía (EDS) Oxford Instruments, INCA Energy 200 acoplado a un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM 6360LV. Se realizaron tres mediciones en diferentes zonas para determinar la composición elemental de Na y Cl de los andamios.

2.3.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Los andamios fabricados a diferentes relaciones de NaCl y pPGS 80/20 70/30 y 60/40 se caracterizaron utilizando FTIR en modo Reflectancia Total Atenuada (ATR), usando un cristal de ZnSe en un equipo Nicolet 8700 FTIR (Thermo Fisher Scientific Inc., EE. UU.); se usó un promedio de 100 barridos, con una resolución de 4 cm^{-1} en un intervalo de número de onda entre 4000 cm^{-1} y 650 cm^{-1} .

2.2.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Los cambios morfológicos en los andamios se determinaron por SEM utilizando un microscopio JEOL 6360LV. Las muestras se montaron sobre portamuestras con cinta de aluminio y se recubrieron con oro para su análisis. Se utilizó un aumento de 50 X y un voltaje de aceleración de 20 kV. Se usó el software ImageJ para obtener el tamaño promedio de poro.

2.2.4 Determinación del porcentaje de Porosidad

La masa y el volumen (V) de los andamios completamente secos y cortados en barras se determinaron antes de la inmersión en agua, y después de la inmersión con agua destilada (Cuando no se observó más aumento de peso). La porosidad de los andamios de PGS generados se determinó mediante la ecuación [104].

$$\text{Porosidad} = \frac{m_e - m_c}{\rho V} \times 100$$

Donde ρ = densidad del agua a 25 °C.

m_e = la masa total después de la inmersión en agua.

m_c = la masa antes de la inmersión en agua

2.2.5 Porcentaje de hinchamiento y densidad de entrecruzamiento

Los andamios de PGS, fabricadas con relaciones de NaCl 80/20, 70/30 y 60/40, inicialmente fueron pesados para obtener la masa inicial (m_i) y posteriormente las muestras fueron sumergidas en tetrahidrofurano (THF) durante 24 horas. El THF fue elegido debido a que el porcentaje de hinchamiento es utilizado posteriormente para determinar la densidad de entrecruzamiento, y en la literatura ya se encuentra reportado un parámetro de interacción para el sistema PGS-THF. Después de las 24 horas, las muestras fueron retiradas y pesadas nuevamente (m_s). Todas las mediciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente en recipientes cerrados para evitar la evaporación del disolvente durante el proceso. La determinación del porcentaje de hinchamiento se obtuvo mediante la ecuación:

$$\% \text{ hinchamiento} = \left(\frac{m_s - m_i}{m_i} \right) \times 100$$

El contenido de fracción soluble (pPGS que no se entrecruza) y el contenido de fracción insoluble (red entrecruzada) fueron igualmente determinados en la muestra. Para esto, las muestras fueron secadas en una estufa a 100 °C y vacío durante dos días; al retirarlas fueron pesadas nuevamente para obtener el contenido de la fracción insoluble m_f . El porcentaje de contenido de fracción soluble en la muestra se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ sol} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100$$

La densidad de entrecruzamiento fue determinada por la teoría de hinchamiento de Flory-Rehner. La teoría de Flory-Rehner involucra las mediciones ya mencionadas de

hinchamiento y las relaciona con el número de cadenas activas en la red entrecruzada por unidad de volumen según las ecuaciones:

$$n = \frac{-[\ln(1 - V_2) + V_2 + X_1 V_2]}{V_1 \left[V_2^{1/3} - \frac{V_2}{2} \right]}$$

y:

$$V_2 = \left[1 + \left(\frac{m_s - m_i}{m_i} \right) \left(\frac{\rho_2}{\rho_1} \right) \right]^{-1}$$

Dónde:

n =Número de segmentos de cadenas activos en la red

V_2 = Fracción volumétrica del polímero en la masa hinchada

V_1 = Volumen molar del disolvente

X_1 = Parámetro de interacción polímero-disolvente = 0.42 (chen *et al* [69], 2008)

ρ_1 = Densidad del polímero

ρ_2 = Densidad del disolvente

m_s = Masa con disolvente

m_i = Masa inicial

2.2.6 Área superficial específica mediante la técnica Brunauer, Emmett y Teller (BET)

El método BET se basa en el cálculo del número de moléculas de adsorbato, en este caso de nitrógeno, adsorbidas en monocapa, es decir, el número de moléculas necesario para cubrir la pared del sólido con una capa única. Al ponerse en contacto un gas con la superficie de un sólido se produce un equilibrio entre las moléculas adsorbidas y las moléculas en fase gaseosa, que depende de la presión del gas y de la temperatura. Los valores de la relación entre las moléculas adsorbidas y la presión, a temperatura constante, se puede obtener en una isoterma de adsorción. Estas isotermas informan directamente el volumen adsorbido a una determinada presión y permiten también calcular el área superficial del sólido, el tamaño de

poro y su distribución, los calores de adsorción, etc. Los andamios PGS 80/20 se desgasificaron a una temperatura de 110°C durante 4 h a una presión de 50 mm Hg. La medida de adsorción de N₂ se realizó en un analizador Micrometrics ASAP 2010 a 77 K, con una presión relativa de 0.01 a 0.99 durante 24 h. La distribución de poros y el área superficial se determinaron utilizando el método DFT (teoría de densidad de desorción).

2.2.7 Análisis termogravimétrico (TGA) del pPGS y PGS.

Con el fin de comparar la estabilidad térmica del pPGS y del andamio PGS 80/20 se realizó un análisis termogravimétrico. Las muestras se calentaron desde 50 °C hasta 650 °C con una rampa de calentamiento de 10 °C/min, bajo atmósfera de nitrógeno. La temperatura máxima de descomposición (Td) se reportó como el pico después de obtener la primera derivada de la curva de la masa vs temperatura.

2.2.8 Ensayos mecánicos a tensión de los andamios PGS 80/20, 70/30 y 60/40.

Las pruebas a tensión se llevaron a cabo en una máquina de pruebas universales Shimadzu (modelo Autograph AGS-X) utilizando una velocidad de cabezal de 10 mm min⁻¹ y una separación de las mordazas de 40 mm. Las dimensiones de las muestras fueron 70 mm (longitud), 5 mm (ancho) y 1 mm (espesor). Los andamios fueron acondicionadas en agua destilada a 37 °C durante 24 horas. El módulo de Young se calculó a partir de la pendiente de la curva esfuerzo vs deformación entre 0.0 y 0.2 de la deformación unitaria (e).

2.2.9 Pérdida de masa de los andamios obtenidos a diferentes porcentajes de pPGS y NaCl

Los andamios obtenidos fueron puestos en envases de polietileno con 10 ml de solución de buffer de fosfatos (PBS; pH 7.4) e incubados *in vitro* a 37 °C durante 4, 8, 12 y 17 días. La disolución fue cambiada cada tercer día para mantener el pH de la solución; las muestras que se iban retirando subsecuentemente fueron enjuagadas con agua destilada y secadas en un horno con vacío a temperatura ambiente por 48 horas. Se calculó la pérdida de masa con la siguiente ecuación.

$$\text{Pérdida de masa (\%)} = \frac{(M_o - M_t) \times 100}{M_o}$$

Donde:

- M_o = Masa inicial del andamio antes de someterse al proceso de pérdida de masa.
- M_t = Masa residual del andamio después del proceso de pérdida de masa.

2.3 Tratamiento superficial de los andamios PGS con PPy-I

Para los tratamientos se utilizó un reactor de plasma acoplado a una fuente de alimentación de radiofrecuencia de 13.56 Hz (Advance Energy, EE. UU.). Los andamios de PGS se seccionaron en rectángulos de 7 cm x 1 cm x 1 cm de espesor. El monómero de pirrol y el yodo se colocaron en contenedores sellados conectados al reactor en diferentes puntos de acceso. La superficie del andamio se activó durante 30 segundos utilizando una potencia de 35 W y una distancia de 10 cm entre los electrodos. Las válvulas de acceso del pirrol y del yodo se abrieron a diferentes presiones: el pirrol a 5×10^{-2} Torr y el yodo a 8×10^{-2} Torr, regulando la presión final a 9×10^{-2} Torr. Los tiempos de tratamiento fueron de 6, 12, 18, 24 y 30 minutos. Del mismo modo, se sintetizaron partículas de PPy-I y PPy en el reactor sobre a 35 W y un tiempo de 30 minutos para realizar pruebas de FTIR, XPS y Uv visible.

2.4 Caracterización fisicoquímica del andamio de PGS tratado con PPy-I

2.4.1 Análisis elemental mediante la energía de rayos X dispersivos (EDX)

El análisis elemental EDX se realizó utilizando las mismas condiciones de la sección 2.3.1. Esto con el fin de determinar la composición elemental de las partículas PPy-I depositadas en la superficie del andamio.

2.4.2 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) de las partículas PPy-I.

Las partículas de PPy y PPy-I se mezclaron con KBr y se caracterizaron utilizando FTIR, en un equipo Nicolet 8700 FTIR (Thermo Fisher Scientific Inc., EE. UU.). Se usó un promedio de 100 barridos, con una resolución de 4 cm^{-1} en un intervalo de número de onda entre 4000

cm^{-1} y 450 cm^{-1} . Lo anterior fue con el fin de identificar las bandas asociadas al polipirrol PPy y el enlace carbono-yodo. Los espectros se normalizaron al pico máximo de intensidad.

2.4.3 Espectroscopia UV visible de las partículas PPy-I

Las transiciones electrónicas de las partículas PPy-I se determinaron por espectroscopia UV-Vis utilizando un espectrómetro Shimadzu modelo UV-2401 en un intervalo de longitudes de onda de 200-800 nm.

2.4.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

Los cambios morfológicos de los andamios tratados con PPy-I fueron monitoreados utilizando las mismas condiciones que se utilizaron en los andamios de la sección 2.2.3, con un aumento de 150 X. El tamaño promedio de las partículas de PPy-I y su distribución de tamaños se determinó utilizando 50 mediciones.

2.4.5 Rugosidad con microscopia de fuerza atómica (AFM)

La rugosidad de los andamios se determinó utilizando un microscopio de fuerza atómica (SPM, Ambios Universal, USA) usando un cantiléver de Si-N en modo de no contacto. La raíz media cuadrática de la rugosidad (por sus siglas en inglés, RMS) fue determinada usando el programa WSxM v5.0 develop 8.1 de Nanotec.

2.4.6 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros FTIR de los andamios tratados con PPy-I en el plasma se obtuvieron mediante la técnica de reflectancia atenuada ATR utilizando las mismas condiciones de la sección 2.2.2.

2.4.7 Espectroscopia Raman

Los espectros Raman de los andamios tratados con PPy-I se llevaron a cabo con una línea de 633 nm de un láser de He-Ne como fuente de excitación. Los espectros Raman se suavizaron con una ventana de 50 puntos con el método Savitzky Golay y una función polinomial de cuarto orden y se normalizaron tomando el máximo pico de intensidad a 1598 cm^{-1} .

2.4.8 Espectroscopia Fotoelectrónica de rayos X (XPS)

El análisis de la composición elemental mediante XPS se llevó a cabo a los andamios antes y después del tratamiento utilizando un equipo ESCA/SAM modelo 560 (Thermo Fisher), equipado con un analizador de espejo cilíndrico de doble paso. Antes de los análisis las muestras fueron erosionadas 15 segundos con un haz de iones de argón acelerados a 3 kV, una presión de vacío de 2×10^{-9} mbar y una potencia de 30 W, el cual incide en un área ovalada de 40 micras. Posteriormente las muestras fueron excitadas con una fuente monocromática de rayos X con una radiación de $AlK\alpha$ y energía de 1486.6 eV y un ángulo de análisis de 30° . Los espectros XPS fueron obtenidos en dos condiciones: espectro de reconocimiento (0-1350V) con energía de paso de 1 eV y el modo de barrido (Scan) con 0.1 eV/paso, energía de paso de 50 eV. Los espectros en modo Scan se deconvolucionaron mediante el software Analyzer utilizando funciones de Voigt, con valores de Lorentziano de 0.35 y 0.25 para las señales C1s y N1s respectivamente y línea base con el método de Shirley-Sherwood.

2.4.9 Mediciones de Ángulo de contacto

Las medidas se realizaron en la superficie de las películas de PGS tratadas para evitar el efecto de capilaridad causado por los poros de los andamios. Las películas fueron sintetizadas y sometidas a las mismas condiciones de los andamios tratados. El ángulo de contacto se determinó entre el ángulo de la superficie de la muestra y la tangente a la superficie de la gota de agua destilada, utilizando un goniómetro óptico (ramé-hart Instrument co.) y una microjeringa (Hamilton, Inc., EE. UU.) de 5 μ l con el software Dropet.

2.5 Caracterización mecánica de los andamios tratados con plasma de PPy-I

2.5.1 Pruebas mecánicas a tensión

Las pruebas a tensión a los andamios de PGS 80/20 tratados a 6, 12, 18, 24 y 30 min en el plasma de PPy-I se realizaron utilizando las mismas condiciones de la sección 2.2.8. El módulo de Young (E) también se calculó a partir de la pendiente de la gráfica entre 0.0 y 0.2 de la deformación (ϵ).

2.6 Caracterización biológica del andamio

2.6.1 Células troncales de Pulpa dental (hDPSCs).

La obtención de las hDPSCs es un proceso que involucró tres etapas: el manejo del paciente en la clínica de odontología de la facultad de odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY); el corte del diente en el laboratorio bajo condiciones estériles y; el cultivo de la pulpa dental para la obtención de las células por explante. El proyecto cuenta con el aval del comité de bioética de la UADY (número de proyecto: CIE 06-2017). Brevemente, se obtuvieron cuatro terceros molares de pacientes masculinos de 18-25 años de edad, quienes después de escuchar sobre el proyecto decidieron participar y firmaron la carta de consentimiento informado. Los terceros molares fueron extraídos de la cavidad bucal por cirujanos dentistas certificados; posteriormente las piezas dentales se lavaron con PBS y se realizó un corte alrededor de la unión cemento y esmalte utilizando un cortador de fresado dental de diamante de 40 mm de diámetro. Una vez expuesta la cámara pulpar, ésta se removió con un tiranervio (Dentsply Maillefer) número 20. En condiciones estériles, la pulpa se disgregó en fragmentos pequeños con ayuda de un bisturí número 3 y hoja número 15; los fragmentos de aproximadamente 2 mm de diámetro se colocaron en una caja de cultivo de 6 pozos conteniendo 1 ml de DMEM, y se mantuvieron por 14 días en una incubadora a 37°C y 5% CO₂ con 90% de humedad. Transcurrido este tiempo, las células liberadas del explante se tripsinizaron con una solución de Tripsina-EDTA al 0.25% y se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos a 4°C para formar el botón celular. Las células obtenidas se sembraron en botellas de cultivo de 25 cm², conteniendo DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% penicilina (100 mg/mL) y estreptomycin (100mg/mL) y, se incubaron a 37°C y 5% de CO₂, con 90 % humedad, con cambio de medio de cultivo cada tercer día hasta alcanzar el 80% de confluencia. Después de la confluencia, las células se tripsinizaron sucesivamente hasta alcanzar el pasaje 5, con el cual se realizó la caracterización celular en presencia de andamios.

2.6.2 Caracterización de la población hDPSCs por citometría de flujo

Para confirmar el fenotipo troncal del pasaje 5, cultivos celulares de hDPSC se tripsinizaron y se contaron en una cámara Neubauer por tinción con azul de tripano. Dos alícuotas con 1x10⁶ células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4 % durante 30 minutos a 4°C.

Posteriormente, las células se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos a 4°C, para obtener el botón celular. El botón celular de cada alícuota se resuspendió en 570 µl de PBS estéril en tubos Trucon (BD Biosciences) y 2.5 µl de anticuerpos CD90-FITC, CD105-PE-Cy5, CD73-APC fueron inmediatamente adicionados a la primera alícuota, mientras que la segunda alícuota se incubó con 2.5 µl de anticuerpos CD34-PE y CD45-FITC. La suspensión celular con los anticuerpos incorporados se agitó en un ThermoMixer a 950 rpm y 22 ° C y, se incubó durante dos horas en la oscuridad total. Finalmente, la presencia de los receptores de superficie se cuantificó en un citómetro de flujo (HERMLE Labortechnik GmbH) mediante la recopilación de 10,000 eventos. Los datos se analizaron utilizando el software Cell Quest (Becton Dickinson).

2.6.3 Esterilización de muestras

Los andamios cortados en forma de cilindros, con un diámetro de 6 mm de diámetro, se purificaron con una solución de cloruro de metileno y etanol 1:1 (v/v); posteriormente fueron sometidos a un segundo lavado con soluciones seriadas de etanol en agua destilada de 70%, 50% y 30% y secadas a vacío. Lo anterior fue con el fin de eliminar cualquier residuo de PPy-I no adherido al material. Finalmente, los andamios fueron esterilizados con radiación UV durante 30 minutos por cada lado.

2.6.4 Viabilidad celular de los andamios de PGS tratados por contacto directo

Cilindros de cada tipo de andamio se colocaron (n=3) en una placa de 96 pozos (Corning Costar); posteriormente se sembraron 5×10^3 células en cada pocillo sobre cada andamio contenidas en 100 µl de DMEM suplementado con 10% SFB y 1 % penicilina-estreptomicina. A los días 1, 3 y 5, se retiró el DMEM, y se lavaron las células con PBS al 1% antibiótico-antimicótico. Se añadieron 100 µl de DMEM fresco, se incubaron durante 4 horas con 20 µl de CellTiter blue Alamar Blue (AB) en una incubadora a 37 °C y 5 % CO₂, con 90% de humedad. A cada tiempo, se transfirieron 100 µl del sobrenadante de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos para realizar las mediciones de absorbancia a 570 nm en un lector multimodal Cytation 3 (BioTek).

2.6.5 Morfología celular

La morfología celular de hDPSCs se analizó mediante SEM. Después de 24 h de incubación, los andamios se lavaron con PBS y se fijaron con solución de glutaraldehído al 2.5% en PBS durante 24 h. Las muestras se remojaron con Hexametildisiloxano en proporciones de 1:2, 1:1 y 1:0 con etanol absoluto a 4°C durante 10 minutos y se secaron a 25°C

2.6.6 Evaluación de citotoxicidad por contacto indirecto

La preparación de los extractos, se basó en la norma ISO 10993-12 para materiales con espesores ≤ 1 mm [125]. Brevemente, se cortaron andamios sin tratamiento y tratados con PPy y PPy-I en forma de cilindros de 1 mm de espesor. Se utilizó una relación entre el área de superficie y el volumen del extractante de 3 cm²/ml; los andamios fueron mantenidos con DMEM suplementado con 10% SFB y 1% penicilina-estreptomicina durante 24 h; posterior a este tiempo, DMEM (extractante) fue separado y colocado en tubos eppendorf de 1.5 mL para su posterior uso en los ensayos.

Para la evaluación de citotoxicidad Alícuotas de 1×10^4 células se colocaron sobre cubreobjetos redondos previamente depositados en placas de 24 pozos y se incubaron en presencia de 300 μ l de los extractos acuosos (sin diluir) de los andamios tratados. El cultivo fue puesto en contacto con los extractos por 24 h. Posteriormente, las células se lavaron con PBS y se llevó a cabo la determinación de la citotoxicidad mediante el ensayo LIVE/DEAD para células mamíferas. Para esto, se añadió a cada pozo una solución de 4 μ M de EthD-1 (etidio) y 3 μ M de calceína AM en PBS y se incubó durante 30 minutos a 37°C. Los cubreobjetos redondos que contienen las células fijadas se colocaron sobre portaobjetos con 2 μ l de Fluoromount como medio de montaje y almacenadas a 4°C hasta su observación. Las imágenes de fluorescencia fueron tomadas en un microscopio confocal Olympus Fv1000, utilizando un láser de alto voltaje con excitación de 488 nm y 615 nm para EthD-1 y calceína AM respectivamente.

2.7 Análisis estadístico

Los datos se expresaron como el promedio con su desviación estándar. Las pruebas se realizaron al menos por triplicado ($n=3$). Para determinar si existe una diferencia estadística significativa entre los tratamientos, se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) mediante la prueba de Tukey. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado como significativo.

CAPÍTULO 3

SÍNTESIS Y OBTENCIÓN DE ANDAMIOS DE PGS

3.1 Apariencia visual del pPGS sintetizado

La policondensación del glicerol y el ácido sebácico forma, en la primera etapa de prepolimerización, un líquido viscoso que al enfriarse adquiere un aspecto de pasta blanca, pegajosa, soluble en distintos disolventes orgánicos como el tetrahidrofurano, diclorometano, trifluoroetanol y etanol absoluto. El pPGS es el resultado de esterificaciones entre el glicerol y el ácido sebácico formando cadenas con un ligero entrecruzamiento debido a reacciones de los grupos carboxilo del ácido con grupos hidroxilo secundarios del alcohol [62].

3.2 Caracterización fisicoquímica de los andamios

3.2.1 Análisis elemental EDS de los andamios PGS generados

Se realizó un análisis por de rayos X con energía dispersa (EDS) para detectar la presencia de partículas de NaCl utilizadas como porógeno en los andamios. El espectro EDS del andamio 80/20 de NaCl/pPGS se muestra en la Figura 3.1, mientras que los resultados en porcentaje atómico se presentan en la tabla 3.1. Se observa que conforme se incrementa la concentración de porógeno en la fabricación de los andamios, se incrementan los porcentajes atómicos de Na y Cl, debido posiblemente, a interacciones físicas entre el porógeno que queda atrapado y el pPGS, ocasionando una posible incompleta lixiviación. Este fenómeno ha sido observado también para la PCL fabricados Salt leaching [126]. El pico observado en aproximadamente en 2.1 keV es atribuido al oro utilizado como recubrimiento de la muestra.

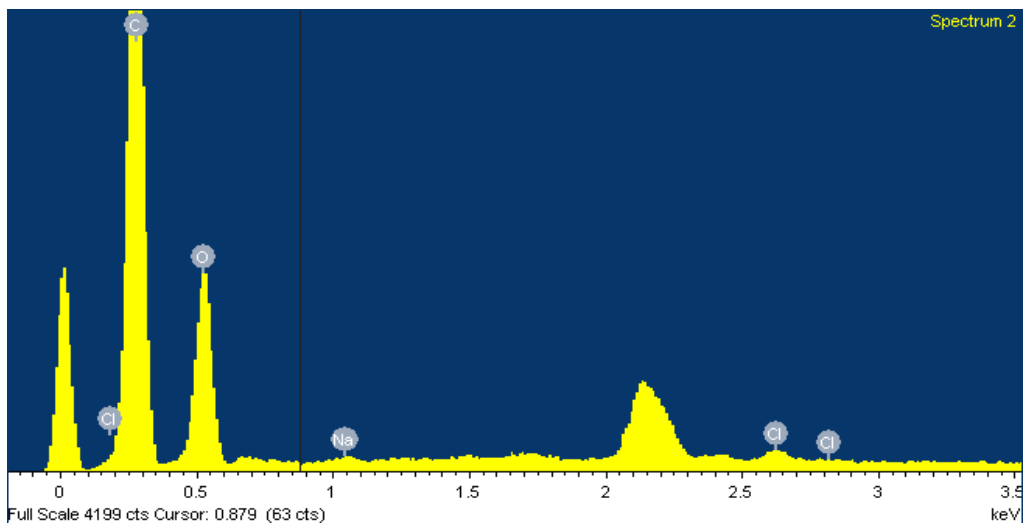


Figura 3.1 EDS de andamios PGS 80/20.

Tabla 3.1 Composición química elemental en % atómico de los andamios

Muestra n=3	Composición química				Relación atómica C/O
	Carbono	Oxígeno	Sodio	Cloro	
pPGS/NaCl					
20/80	71.7±5.1	26.07±4.2	1.0±0.8	1.0±0.05	2.6
30/70	68.8±1.1	30.7±1.2	0.4±0.1	0.3±0.1	2.2
40/60	67.9±0.5	31.76±0.5	0.2±0.1	0.1±0.1	2.1

3.2.2 Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Como se puede observar en la Figura 3.2, el espectro del ácido sebácico presenta un pico característico en torno a 1700 cm^{-1} correspondiente al enlace -C=O del ácido carboxílico, mientras que el espectro del glicerol presenta una banda ancha entre 3300 cm^{-1} y 3400 cm^{-1} del enlace -OH de los grupos alcohol. Por otro lado, se muestra el espectro FTIR del pPGS sintetizado a 140°C , donde se observa absorciones a 2930 cm^{-1} y 2855 cm^{-1} , las cuales corresponden a enlaces asimétrico y simétricos del grupo metileno, y picos intensos a 1730 cm^{-1} y 1164 cm^{-1} correspondientes al grupo carbonilo C=O y al grupo C-O respectivamente. Se observa que la banda en 1687 cm^{-1} del ácido sebácico característico del carbonilo del ácido carboxílico se desplaza hacia valores de número de onda de 1730 cm^{-1} correspondiente

al grupo carbonilo del éster que se forma como resultado de la reacción de prepolimerización que da lugar al pPGS. Además, se observó una reducción de la banda localizada aproximadamente a 3500 cm^{-1} del pPGS, característico del estiramiento de los enlaces OH en un ambiente de puente de hidrogeno, lo cual implica que los grupos hidroxilo son consumidos para formar los grupos éster. Durante el proceso de entrecruzamiento, los grupos OH remanentes en el glicerol, reaccionan con los grupos carboxílicos que hasta ese momento no habían reaccionado en el ácido sebácico por lo que se reducen los picos asociados a la absorción de los grupos OH

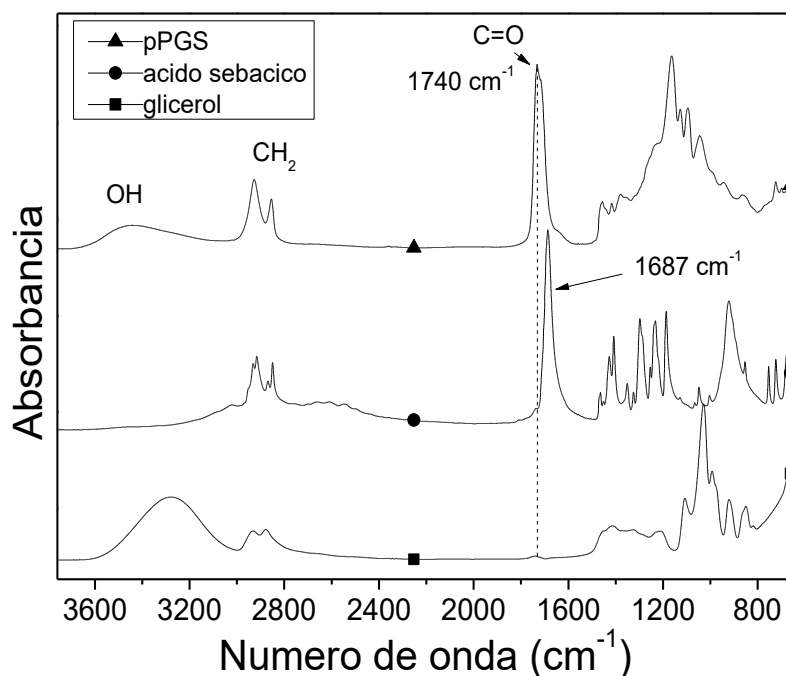


Figura 3.2 Espectros FTIR monómeros y pPGS,

En la Figura 3.3 se observan los espectros de FTIR de los andamios de PGS a diferentes concentraciones de porógeno. En todas las muestras se observa un pico de absorción amplio del grupo hidroxilo a 3500 cm^{-1} y absorciones a 2930 cm^{-1} y 2850 cm^{-1} , las cuales corresponden al estiramiento asimétrico y simétrico CH₂ de los grupos metileno [127]. También se observan dos picos intensos a 1740 cm^{-1} y 1164 cm^{-1} correspondientes a los

enlaces en estiramiento de los grupos carbonilo C=O y C-O respectivamente las cuales confirman la formación de enlaces éster e indican la síntesis exitosa del PGS [128]. También se observó un pico localizado en 1040 cm^{-1} característicos del enlace C-OH en flexión fuera del plano.

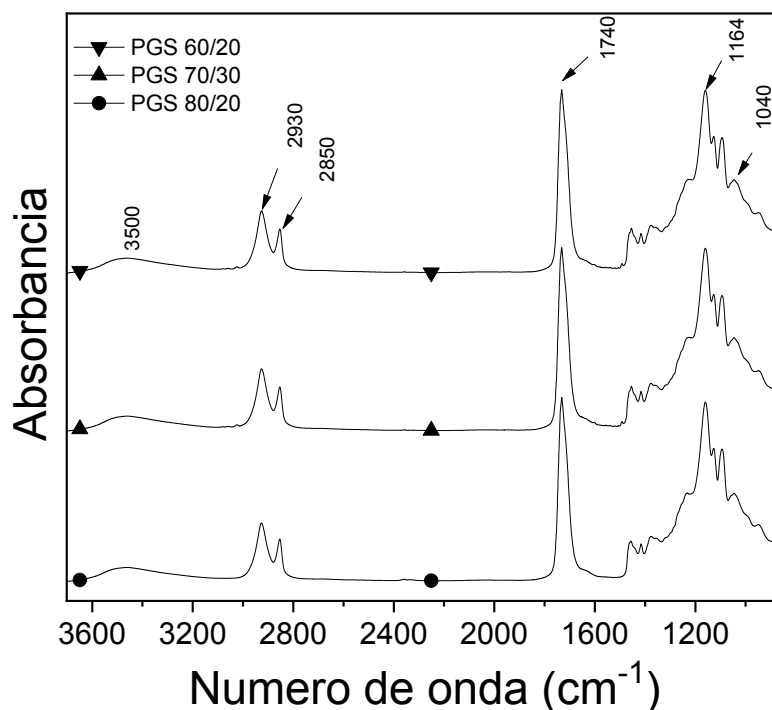


Figura 3.3 Andamios PGS 80/20, 70/30 y 60/40.

3.2.3 Microscopia electrónica de Barrido (MEB), porosidad, y tamaño de poro promedio.

En la Figura 3.4 a-c se muestran las estructuras de los andamios de PGS obtenidos con 60%, 70% y 80% de contenido de NaCl con tamaños entre $105\text{ }\mu\text{m}$ y $180\text{ }\mu\text{m}$. Se puede observar que a una relación 60/40 se formaron algunos poros grandes con un tamaño de alrededor de $500\text{ }\mu\text{m}$ (flecha roja); para las relaciones 70/20 y 60/30 se detectaron poros del orden de los $400\text{ }\mu\text{m}$ con una baja interconectividad entre ellos. La baja interconectividad puede ser atribuida a la elevada concentración de pPGS presente en la mezcla y a menores contactos entre las partículas de porógeno. Cuando la concentración de porógeno fue del 80% (relación

80/20) se observó una interconectividad total y una estructura porosa más abierta, que refleja la geometría del porógeno, y con algunos tamaños de poro alrededor de 100 μm (Figura 3.4 a). Por otro lado, en la Figura 3.4 d se observa el efecto del porógeno sobre la porosidad de los andamios, ya que la temperatura y el tiempo de entrecruzamiento se mantuvieron constante. La porosidad en función del contenido de NaCl muestra un incremento lineal conforme se incrementa la cantidad de porógeno utilizada en la matriz, con valores de $42\pm 4\%$, $59\pm 5\%$ y $70\pm 6\%$ respectivamente.

Es claro que a medida que se incrementa el contenido de porógeno, aumenta el dominio microporoso y los poros grandes desaparecen parcialmente disminuyendo la amplitud de la distribución de los tamaños de poro (Figura 3.5). Las mediciones realizadas a los poros inferiores a 100 μm de los andamios con el software Image-J revelaron que los incrementos de los tamaños fueron $29 \pm 12 \mu\text{m}$, $44 \pm 13 \mu\text{m}$ y $49 \pm 15 \mu\text{m}$ para las relaciones 60/40, 70/30 y 80/20 respectivamente. El tamaño de los poros y la dispersión de los andamios indican que la porosidad obtenida pertenece al dominio de los macroporos. En la Figura 3.5, también se puede observar que el andamio PGS 80/20 ofrece una distribución de poros más uniforme, por lo tanto, se seleccionó para la modificación del plasma con PPy-I.

Estas características probablemente impacten de manera positiva en la eliminación de productos de desecho y en el intercambio de nutrientes para la alimentación de las células adheridas o, en contacto con el andamio, ya que se ha reportado que un tamaño de poro del orden de 100 μm influye de manera positiva en la proliferación y niveles de mineralización de las hDPSCs [120]. Reportes con hDPSCs han demostrado que poros pequeños, menores a 10 μm , favorecen la adhesión celular inicial [129, 130], aunque pueden inducir necrosis debido al limitado movimiento de las células y acumulación de desechos metabólicos. Por el contrario, tamaños de poro mayores, entre 100 y 200 μm , son más adecuados para el crecimiento de hDPSCs [40, 86], las cuales son una fuente prometedora para regeneración ósea [118]. En este sentido, Gu *et al* reportaron que andamios con tamaño de poro entre 20 y 200 μm promueve una tasa de proliferación de hDPSC y diferenciación hacia linaje osteogénico [120].

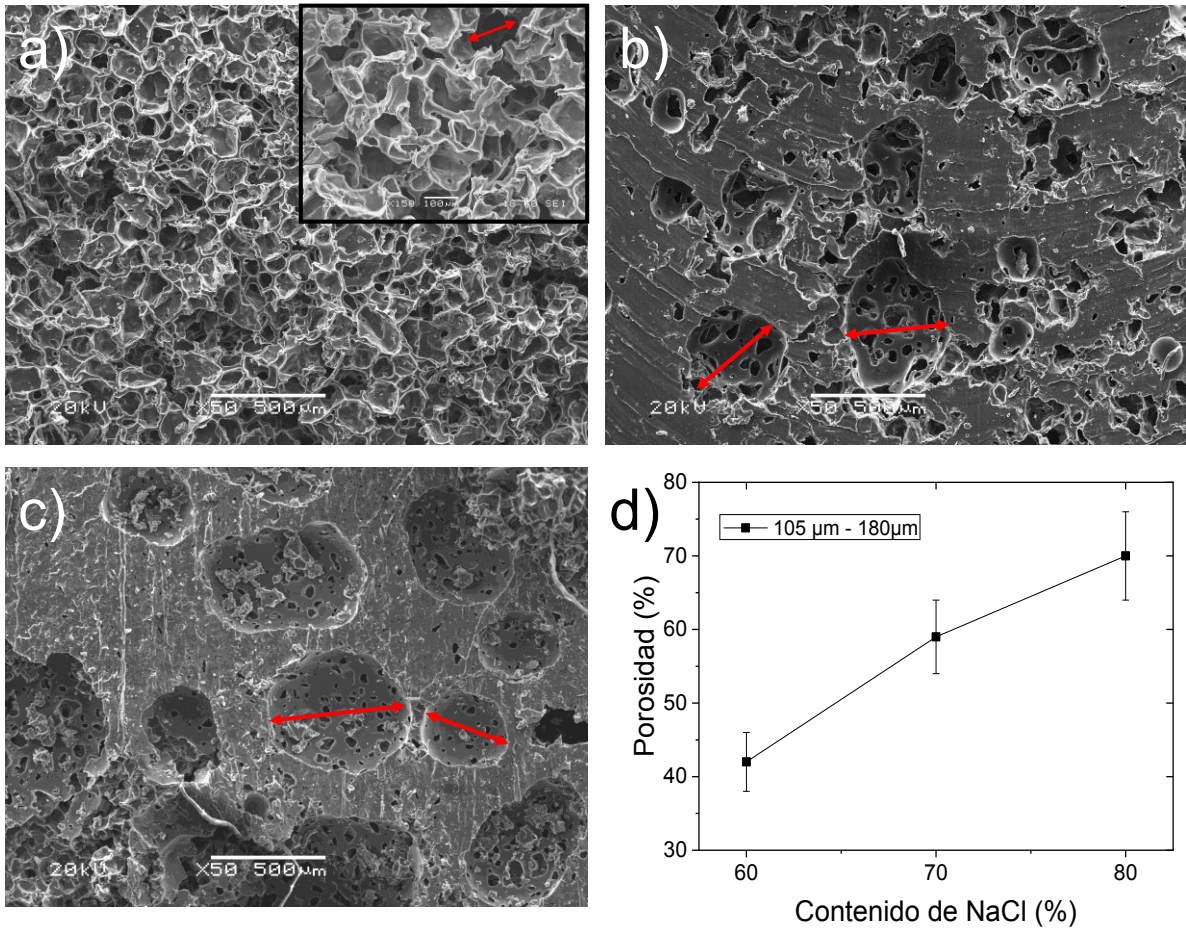


Figura 3.4 Micrografías MEB de los andamios PGS; a) 80/20; aumento 50 X, recuadro superior derecha; aumento 150 X b) 70/30 y c) 60/40% d) porosidad del andamio con tamaños de porógeno entre 105 µm y 180 µm.

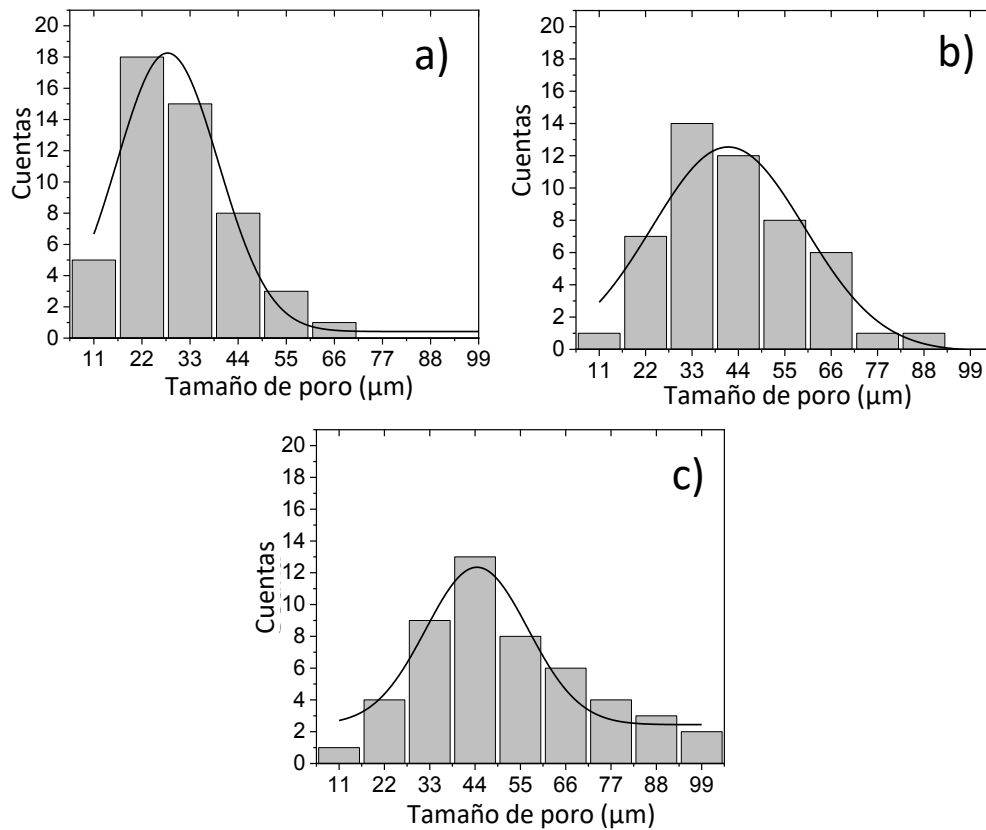


Figura 3.5 Distribucion de tamaño de poro a) 60/40, b) 70/30 c) 80/20 con un tamaño de porógeno entre 105 μm – 180 μm . No se consideraron los poros mayores de 100 μm .

La temperatura y tiempo de curado también son parámetros que influyen en la morfología de los andamios. Del análisis de las micrografías (figuras no mostradas), se determinó que el tiempo más adecuado para la formación de la estructura del andamio de PGS, fue de 12 horas, ya que sus dimensiones después del proceso de liofilizado se mantuvieron. Se observó que los andamios con tiempos de curado menor a 8 horas, cambian sus dimensiones aproximadamente un 50% después de liofilizarse; esto puede atribuirse a un bajo grado de entrecruzamiento, ya que ha sido reportado que el andamio formado a tiempos menores de 10 horas corresponde a un hidrogel [60].

Por otro lado, se observó que el tiempo de la disolución de porógeno tiene poco efecto sobre la porosidad en el andamio. Una disolución más allá del segundo día pareció ser de poco beneficio para aumentar la interconectividad de los poros, también se observó que los andamios que se encuentran en la disolución con etanol absoluto y mezclas de etanol/agua se mantiene hinchados, al desalojar la disolución se contraen o sea que es un material adhesivo y cohesivo, que se deformaban fácilmente debido al bajo grado de entrecruzamiento. Por otro lado, un mayor hinchamiento de los andamios en la disolución indica una mayor cantidad de volumen libre para la permeabilidad del agua.

La interconectividad del andamio 80/20 a lo largo de toda la arquitectura porosa se corroboró mediante la comparación de la superficie con un corte en su sección transversal (Figura 3.6), donde se observó el mismo patrón de conectividad de poros [65, 98]. En los andamios 80/20 también se detectaron algunos microporos por debajo de las 15 μm , los cuales no corresponden con los tamaños de porógeno. El agua por sí sola no hincha el PGS, estos microporos no se generaron por la penetración de agua en el polímero durante la lixiviación ni durante la liofilización. Los microporos probablemente fueron creados por la eliminación de glicerol. En este sentido Gao *et al* [97], reportaron que el proceso de entrecruzamiento involucra probablemente la reacción de transesterificación que puede ocurrir en toda la matriz del polímero durante policondensación, permitiendo que parte del glicerol sirva como un porógeno que puede producir microporos en los andamios resultantes. Los autores también reportan que análisis de resonancia magnética nuclear (NMR) de los productos de condensación formados durante el entrecruzamiento de PGS existe la presencia de glicerol en cantidades significativas y, que la eliminación del glicerol durante la reacción de transesterificación es mayor a 150 °C, lo que incrementa la formación de microporos.

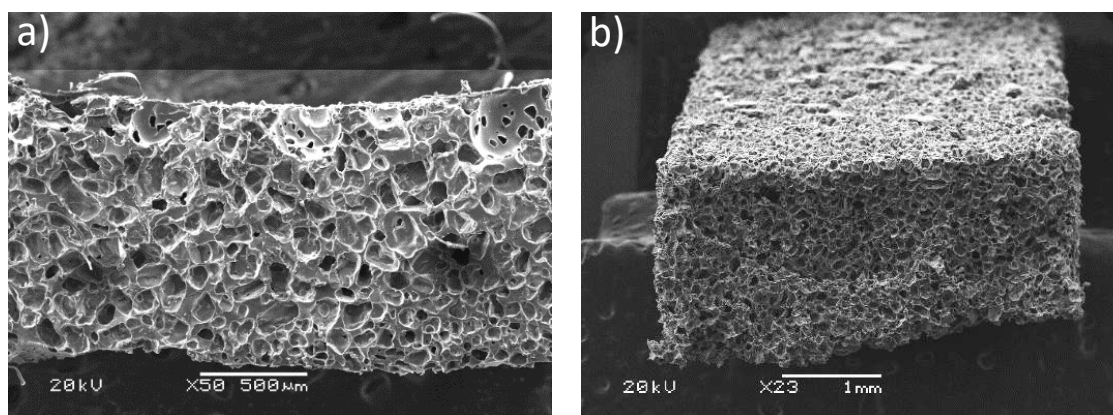


Figura 3. 6 Micrografías MEB del andamio 80/20; a) de la sección transversal 50X, b) vista lateral 23X.

3.2.4 Grado de entrecruzamiento por hinchamiento de tetrahidrofurano THF

La Figura 3.7 muestra la relación de la fracción soluble y el porcentaje de hinchamiento de los andamios fabricados a las tres relaciones de porógeno y de pPGS. Se observó que con el incremento de la cantidad de porógeno, el contenido de la fracción soluble se reduce, encontrando valores de 8.1 ± 3.6 , 6.2 ± 2.2 y $5 \pm 1.5\%$ para las relaciones 60/20, 70/30 y 80/20 con diferencias estadísticamente significativas entre las relaciones 60/40 y 80/20. En este sentido Patel *et al*; reportó un valor de $9.9 \pm 4.3\%$ para la fracción soluble de una película de PGS denso, coincidiendo con la tendencia reportada en este trabajo [59].

Por otro lado, el porcentaje de hinchamiento de los andamios en THF se incrementa significativamente en comparación de una película densa con las mismas dimensiones de los andamios generados. Este incremento está en función de la cantidad de porógeno utilizado. Esto es inesperado, si se considera que solo debería incrementar la rapidez de hinchamiento pues la composición química es la misma, probablemente existe solvente libre en los andamios porosos y no todo está enlazado con el material. Los valores fueron de $370 \pm 33\%$, $430 \pm 67\%$ y $520 \pm 22\%$ para relaciones 60/40, 70/30 y 80/20 respectivamente. Sin embargo, en este trabajo, consideramos que parte del incremento del hinchamiento es atribuido a la porosidad, ya que los poros interconectados incrementan la superficie de los andamios de

PGS y facilitan el contacto del THF con los andamios para que se dé lugar el hinchamiento. El grado de entrecruzamiento determina el volumen libre que hay entre cadenas, que es donde se aloja el disolvente absorbido: esto significa que, al estar menos entrecruzado, el espacio entre cadenas es más grande y más disolvente puede penetrar [131].

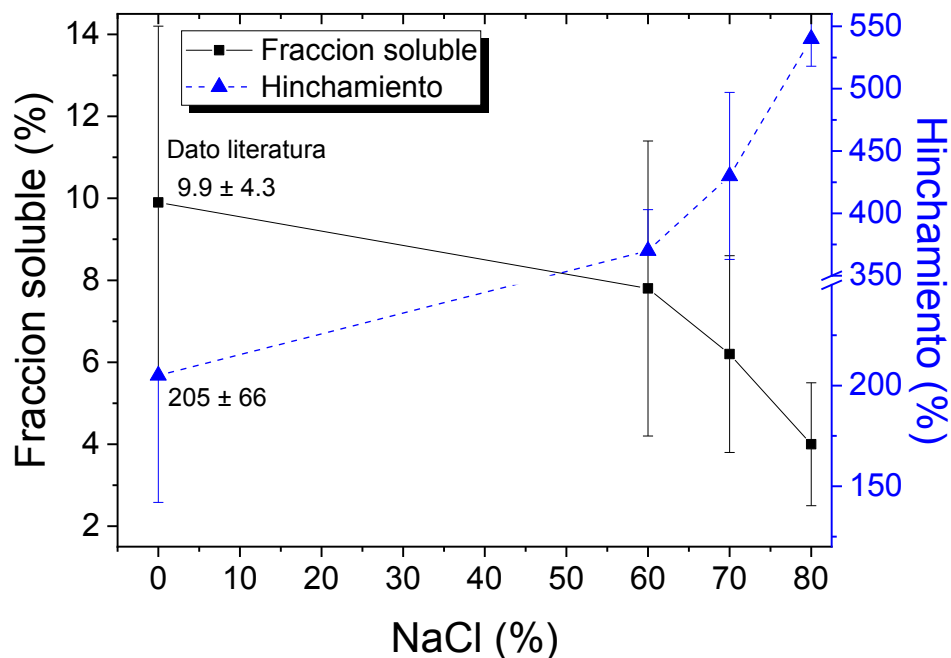


Figura 3.7 Porcentajes de fracción soluble e hinchamiento de los andamios generados.

La fracción soluble se compone principalmente del glicerol sin reaccionar [132], por lo que la reducción de la fracción soluble indica un incremento en el rendimiento de la reacción de entrecruzamiento. Esto podría parecer inesperado si se considera que las partículas de NaCl limitan el movimiento molecular del pPGS reduciendo el proceso de esterificación durante el entrecruzamiento. Sin embargo, esto es debido, posiblemente, que las partículas de NaCl disminuyen el número de cadenas moleculares del pPGS por volumen, lo que permite a este reaccionar más con las cadenas adyacentes del ácido sebácico, ósea, el incremento de la cantidad de partículas de NaCl promueve la densidad de entrecruzamiento del polímero que forma el andamio.

En la tabla 3.2 se puede observar la densidad de entrecruzamiento determinada por el método de Flory-Rehner, llamado también método de hinchamiento. Se puede notar que este parámetro aumenta claramente, aunque sin cambio significativo con la cantidad de porógeno con el que es fabricado el andamio. La densidad de entrecruzamiento determina el espacio que hay entre cadenas, que es donde se aloja el disolvente absorbido. Esto significa que, al estar menos entrecruzado, el espacio entre cadenas es más grande y, por tanto, más disolvente puede penetrar.

Tabla 3.2 Densidad de entrecruzamiento determinada por el método de hinchamiento.

NaCl/pPGS	Hinchamiento	
	Densidad de entrecruzamiento (mol/cm ³)	Mc (g/mol)
60/40	1.40 (10 ⁻³) ± 2.2 (10 ⁻⁴)	803.50 ± 115
70/30	1.36 (10 ⁻³) ± 1.8 (10 ⁻⁴)	827.83 ± 215
80/20	1.21 (10 ⁻³) ± 1.0(10 ⁻⁴)	926.38 ± 185

n=3, ± desviación estándar, Mc=distancia entre puntos de entrecruzamiento.

3.2.5 Área Superficial específica por el método de BET (Brunauer, Emmett y Teller)

Las Figuras 3.8 muestran la isoterma de adsorción y desorción, obtenida para del andamio 80/20 . Este tipo de isoterma (tipo III) indica interacciones débiles entre el adsorbato y adsorbentes, además es característica de estructuras mesoporosas. El área de superficial específica en el andamio de PGS 80/20 calculada por el método BET fue de 2.12 m² g⁻¹. La Figura 3.9 muestra la distribución de tamaño de poros, se observa que se obtuvieron más diámetros de alrededor de 3nm, que también corresponde a una estructura mesoporosa. Este comportamiento mesoporoso del andamio puede incrementar la proliferación, debido a la facilidad de difusión de factores de crecimiento y fármacos. Además, se ha demostrado que

estructuras mesoporosas exhiben propiedades osteogénicas y angiogénicas excepcionales, adecuadas para aplicaciones biomédicas [133].

Los andamios deben ser permeables con poros interconectados para facilitar la proliferación y migración celular, así como el flujo de nutrientes. Murphy *et al*; demostró que la permeabilidad aumenta al aumentar el tamaño de poro debido a una reducción en el área de superficie específica. Sin embargo, si los poros son demasiado grandes, hay una disminución en el área de superficie específica. Se ha reportado que una reducción en el área de superficie específica reduce los sitios de unión celular disponible para que las células se adhieran al material. En este contexto áreas superficiales específicas mayores a $0.1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ incrementan la adhesión celular, sin presentar una relación lineal [88]. Por otro lado la figura 3.9 muestra que el tamaño de poro interno es de 3 nm.

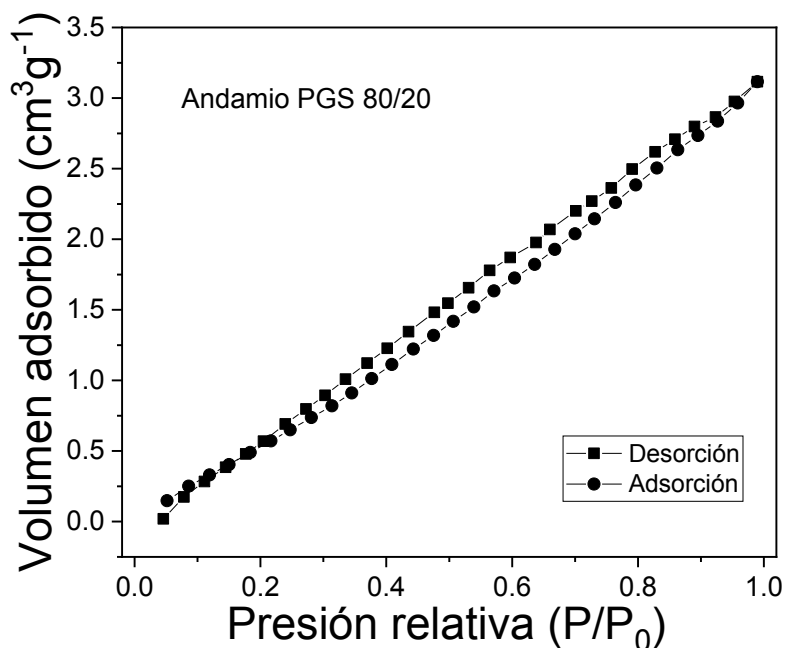


Figura 3.8 Isotherma de adsorción-desorción de nitrógeno del andamio PGS 80/20

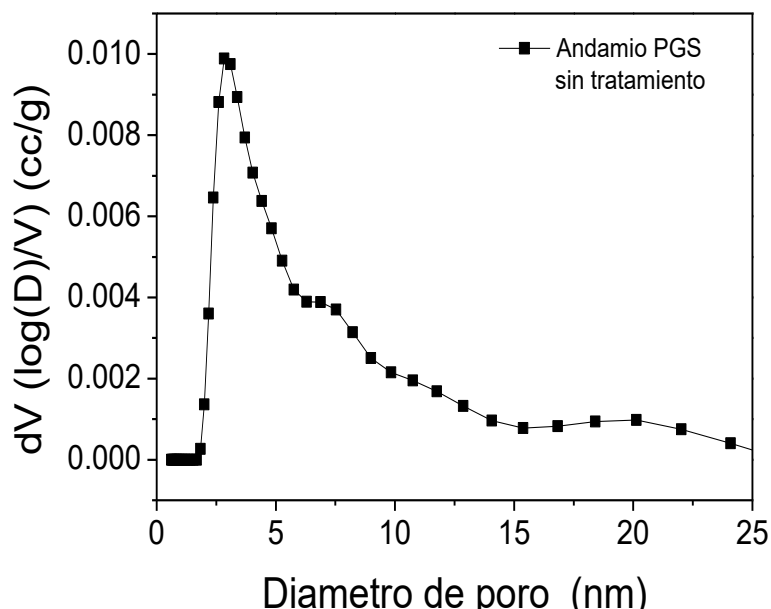


Figura 3.9 Distribución del tamaño de poro del andamio PGS 80/20

3.2.6 Análisis termogravimétrico (TGA)

En la Figura 3.10 se muestra la pérdida de peso vs temperatura del pPGS y del andamio PGS 80/20, donde se observa que el pPGS comienza a descomponerse antes que el andamio, ya que en el andamio no hay una pérdida de peso significativa hasta una temperatura de 260 °C, que corresponde a una pérdida de peso del 2 %. El porcentaje final de masa residual del pPGS fue de 2.98 % mientras que del andamio fue de 7.75 %, las diferencias en estos valores, pueden atribuirse a que en el andamio existen mayores productos relacionados con el carbono que se forman a 650°C. Sin embargo, Kerativitayanan *et al*, reportaron que el PGS se descompone totalmente a 750 °C [134].

La Figura 3.11 se observa la derivada de la pérdida de peso, esto con el fin de determinar la temperatura a la que el material se descompone. En el pPGS se identifican tres fases de degradación térmica; la primera fase es apenas distinguible en la curva TGA, pero es muy evidente en la curva DTG correspondiente. A una rapidez de calentamiento de 10 °C/min, la primera fase a 150 °C, puede ser atribuido a la evaporación del agua, una segunda fase presente, que comenzó a 276 °C y finalizó a 340 °C, que es atribuido a los monómeros

residuales [135, 136]. La tercera fase a una temperatura de 458°C correspondiente a la descomposición de las cadenas del pPGS. Mientras que para el andamio se observó que la temperatura de descomposición fue de 450 °C, atribuido al PGS entrecruzado [66]. La presencia de tres picos de descomposición en el PGS entrecruzado indica la existencia de un mecanismo complejo donde intervienen diferentes especies químicas.

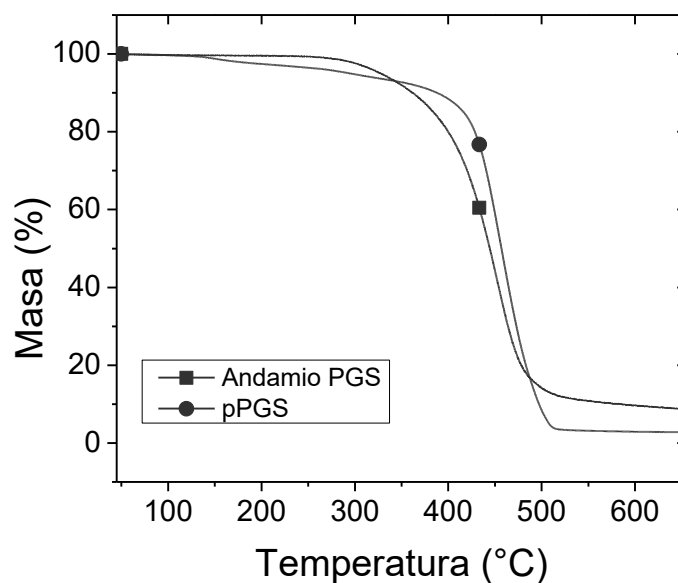


Figura 3.10 Pérdida de peso vs temperatura del pPGS y andamio 80/20

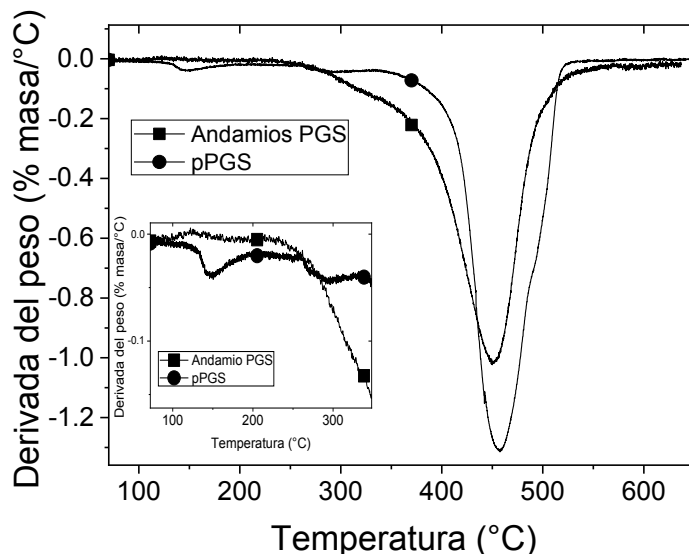


Figura 3.11 Grafica de la derivada de la masa vs temperatura del pPGS y andamio 80/20.

3.2.7 Propiedades mecánicas

Las pruebas mecánicas fueron realizadas a los andamios obtenidos, a las diferentes concentraciones de porógeno, en muestras acondicionadas en agua destilada durante 24 horas a 37 °C. En la tabla 3.3 se resumen las propiedades mecánicas de los andamios de PGS fabricadas con relaciones NaCl/pPGS 60/40, 70/30 y 80/20. Los resultados muestran que las propiedades mecánicas tienen un efecto directamente proporcional al contenido de porógeno utilizado. Conforme se incrementa la cantidad de porógeno, la resistencia mecánica a tensión y el porcentaje de deformación disminuyen. Esto es debido, al incremento en la porosidad y tamaños poro con paredes delgadas actúan como concentradores de esfuerzos, generando defectos mecánicos, reduciendo estas propiedades.

La Figura 3.12 muestra gráficas esfuerzo vs deformación representativa de los andamios acondicionados, donde se observa una reducción en su resistencia mecánica con valores de 43.5 ± 2 kPa, 44.5 ± 3 kPa y 31.4 ± 5 kPa para los andamios 60/40, 70/30 y 80/20 respectivamente, así como un incremento en su porcentaje de deformación con valores de 91 ± 39 %, 158 ± 53 % y 174 ± 21 %. A diferencia de otros polímeros como la PCL para la fabricación de andamios mediante la técnica de lixiviación con NaCl utilizando más de 60% de NaCl, los andamios obtenidos en este trabajo no perdieron su integridad estructural [137]. Interesantemente los andamios 70/30 y 60/40 acondicionados no presentaron cambios significativos en sus módulos de Young, esto es debido posiblemente que el módulo de Young es una propiedad intrínseca del material y no debería depender significativamente de la morfología que presenta los andamios.

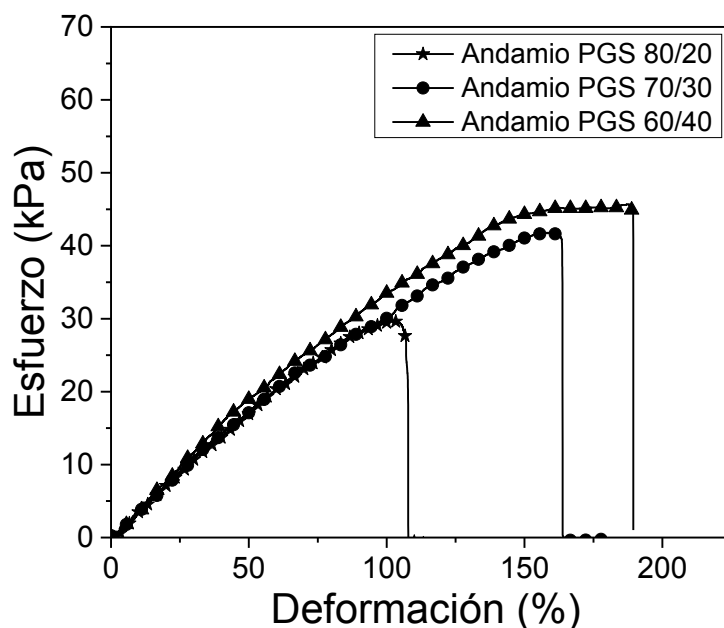


Figura 3. 12 Curvas esfuerzo vs deformación de los andamios de PGS acondicionados en agua destilada.

Tabla 3.3 Propiedades mecánicas de los andamios.

Porcentaje de NaCl N=5	Módulo elástico (kPa) Húmedo	Resistencia Máxima (kPa) Húmedo	Deformación Máxima (%) Húmedo
0 %	249 ± 8	155.4 ± 3	108 ± 06
60%	61.2 ± 4	43.5 ± 4	174 ± 21
70%	50.8 ± 5	44.5 ± 5	158 ± 53
80%	40.7 ± 7	31.4 ± 6	91 ± 39

3.2.8 Pérdida de masa

La Figura 3.13 muestra los resultados de la pérdida de masa de los andamios PGS 80/20, 70/30 y 60/40 en PBS hasta 12 semanas. Los andamios exhibieron una pérdida lenta al principio, y luego, a partir de la sexta semana, una rápida pérdida. Los valores de masa

residual de los andamios PGS 80/20, 70/30 y 60/40 a la semana 12 fueron $73\pm 3\%$, $75\pm 2\%$ y $71\pm 5\%$ respectivamente. También se realizó el análisis a la película de PGS utilizando las mismas condiciones de síntesis llevadas a cabo en los andamios. Se encontró que estas películas tuvieron una mayor masa residual con un valor 44% después de 12 semanas. La enorme diferencia en la velocidad de pérdida de masa entre las películas de PGS y los andamios porosos puede atribuirse a los monómeros residuales que no ha sido eliminado y que aun forma parte importante las películas de PGS [68].

En condiciones fisiológicas, los andamios de PGS se degradan por hidrólisis en productos metabolizables, los cuáles se han reportado como no tóxicos [138]. La rapidez de pérdida de masa depende de las condiciones de síntesis. A diferencia de otros polímeros, el PGS se degrada principalmente por erosión de superficie, debido a su naturaleza hidrófoba, sufriendo una pérdida de masa lineal. Esto puede permitir que el polímero conserve en gran medida su integridad estructural y propiedades mecánicas iniciales. Algunos autores han reportado que el PGS produce lixiviados con toxicidad celular significativa [73]. La toxicidad es causada por grupos de ácido carboxílico sin reaccionar o por los ácidos carboxílicos producidos por hidrólisis acuosa de los grupos éster PGS, que reducen el pH a valores fisiológicos inferiores en un intervalo de 7.2 y 7.4. por lo que es necesario una serie de lavados con el fin de disminuir esta posible citotoxicidad. Un producto de degradación ácida no es exclusivo de los polímeros PGS, también se ha documentado que los poliésteres termoplásticos biodegradables que se comportan de manera similar, reduciendo su capacidad de soporte celular.

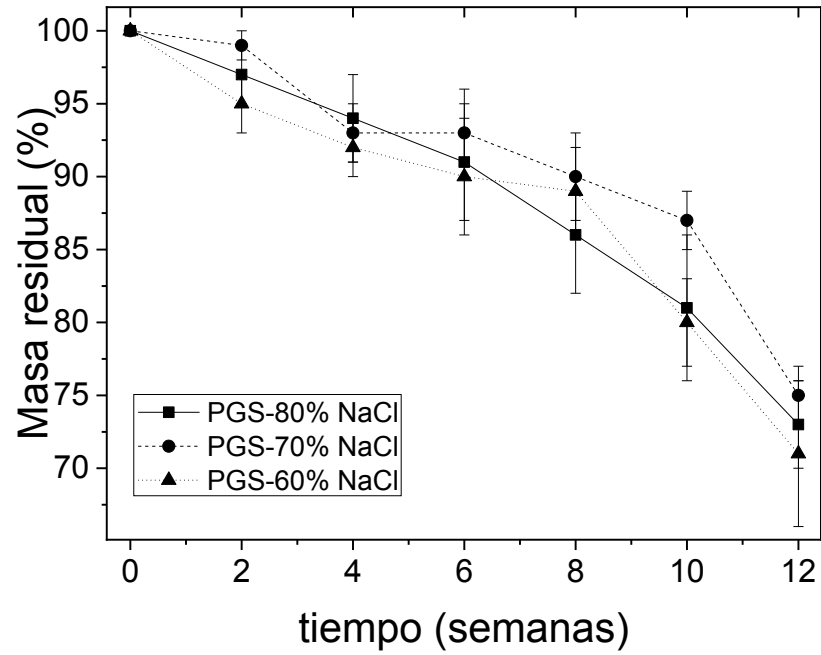


Figura 3.13 Porcentaje de masa residual de los andamios PGS 80/20, 70/30 y 60/40.

CAPÍTULO 4

ANDAMIOS PGS 80/20 TRATADOS CON PLASMA DE PPy-I.

4.1 Caracterización de las partículas de PPy-I

4.1.1 Espectrometría de dispersión de energía de rayos X (EDS) de las partículas PPy y PPy-I

La Tabla 4.1 y la Figura 4.1 muestran el análisis elemental, en porcentaje atómico, del PPy-I sintetizado por plasma durante 30 minutos y el espectro EDS. La relación estequiometría C/N del monómero de pirrol es de 4 [139]. Al finalizar el tiempo en el plasma, para las partículas generadas de PPy-I, esta relación se incrementa a un valor 5.0. Esto indica que el nitrógeno del PPy se reduce, debido, probablemente a las reacciones de entrecruzamiento que se dan en el plasma de alta energía. Por otro lado, la relación (78.3 entre 4 átomos de carbono del pirrol) dividido entre los átomos de yodo fue de 16.3, indicando la presencia de una molécula de yodo por cada 16 de pirrol. Además, se detectó la presencia de oxígeno en las partículas de PPy-I debido a la oxidación del PPy con el aire.

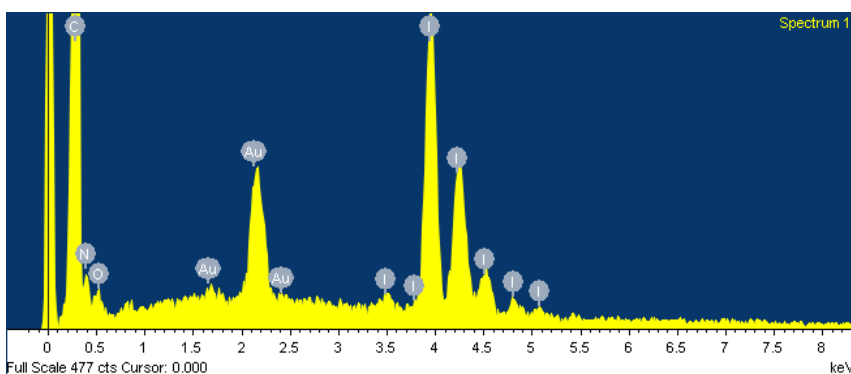


Tabla 4.1 (% at.) PPy-I

Elemento	% at.
C	78.3±1.4
N	15.4±1.2
O	3.3±0.5
I	1.2±0.1
C/N	5.0
C/O	23.7
C/4/I	16.3

Figura 4.1 EDX de partículas de PPy-I.

4.1.2 Espectroscopia FTIR de las partículas PPy y PPy/I sintetizado en plasma.

En la Figura 4.2 a y b se muestran los espectros FTIR del monómero de pirrol, PPy y PPy-I. El espectro FTIR del PPy muestra una banda en 3350 cm^{-1} atribuido al grupo amina NH en estiramiento [140, 141], un pequeño hombro en 3130 cm^{-1} atribuido al grupo C-H aromático, las bandas 2923 cm^{-1} y 2870 cm^{-1} atribuidas al estiramiento de grupos metilenos C-H,

asimétrico y simétrico respectivamente [142]. La banda en 2220 cm^{-1} atribuido al grupo nitrilo $\text{C}\equiv\text{N}$ y/o $\text{C}\equiv\text{C}$ en estiramiento, más la presencia de la banda en 2958 cm^{-1} del grupo metilo, sugiere la rotura de algunos anillos de monómero de pirrol, también se observa una banda amplia en 1620 cm^{-1} correspondiente a la vibración del grupo $\text{C}=\text{C}$ del esqueleto del PPy y, posiblemente, a contribuciones del grupo imina $\text{C}=\text{N}$ en estiramiento, con un pequeño hombro en 1550 cm^{-1} atribuido a grupos amina [141, 143, 144]. En el espectro del PPy también se observan bandas características asociados con el anillo aromático de pirrol, por ejemplo; las bandas en 1380 cm^{-1} y 1458 cm^{-1} , asociadas con vibraciones en el plano del pirrol [142, 145], dos picos intensos en 730 cm^{-1} y 790 cm^{-1} característico del grupo C-H en deformación [146], las bandas en 1080 cm^{-1} y 1030 cm^{-1} atribuido al enlace C-N en estiramiento. En el espectro del PPy, también se observa una banda alrededor de 1420 cm^{-1} atribuida al grupo C-H de flexión en el plano [142, 146, 147]. En el espectro FTIR del PPy-I esta banda en 1420 cm^{-1} se desvía a 1400 cm^{-1} , probablemente, debido alguna interacción con el yodo. En el espectro del PPy-I se observó también una banda entre 500 cm^{-1} y 550 cm^{-1} atribuida al grupo C-I, lo que confirma la incorporación del yodo en las partículas de PPy [145, 148]. Por otro lado, el espectro FTIR de las partículas de PPy-I, se observa que la intensidad de la banda de metilo en 1380 cm^{-1} es menos intensa que la de metileno en 1450 cm^{-1} , esto probablemente indique algún tipo ruptura de las cadenas poliméricas de las partículas de PPy-I, donde este se compone principalmente de cadenas poliméricas cortas en lugar de ramificaciones lineales de estructuras largas.

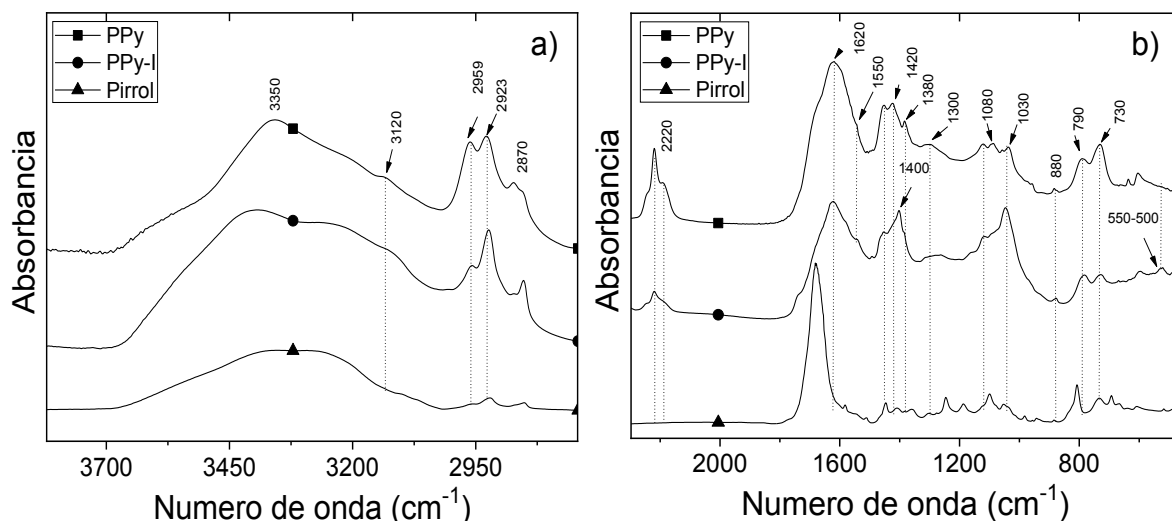


Figura 4.2 Espectro FTIR del monómero de pirrol, y las partículas de PPy y PPy-I, a) región 3750- 3850 cm^{-1} b) región 2250-500 cm^{-1}

4.1.3 Espectroscopia UV visible de las partículas PPy y PPy/I sintetizadas por plasma.

La Figura 4.3 muestra los espectros de absorción ultravioleta del PPy y del PPy-I. El espectro del PPy absorbe luz en el intervalo de longitud de onda entre 290 nm y 600 nm con dos picos; el primero en 336 nm y el segundo en 356 nm, estas absorciones está relacionada con las transiciones $\pi-\pi^*$ en el sistema conjugado de anillos heterocíclicos del PPy [149]. El espectro UV de absorción del PPy-I presenta adicionalmente un pico centrado en 410 nm, debido probablemente, a la absorción del anión triyoduro I_3^- [150-152] lo cual, sugiere formación de complejos de transferencia de carga entre el PPy y el yodo [144].

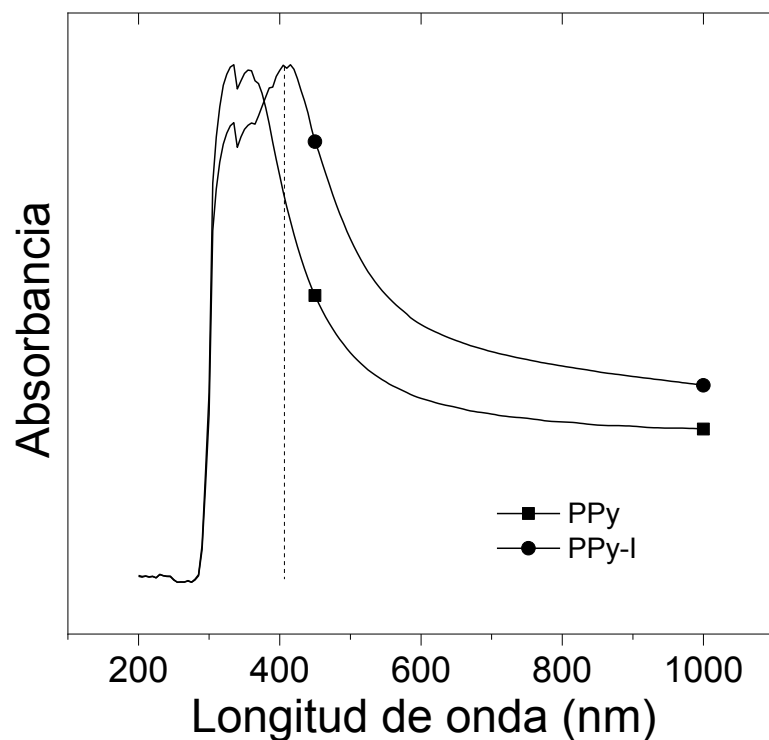


Figura 4.3 Espectroscopia Uv visible de las partículas de PPy y PPy-I.

4.2 Caracterización de andamio tratados con plasma de PPy-I

4.2.1 Microscopia electrónica de barrido (MEB)

En base a los resultados del capítulo 3, el andamio 80/20 fue seleccionado para los tratamientos con PPy-I, esto debido a que mostro una distribución de tamaños de poro más uniforme. La Figura 4.4 (b-f) muestra las micrografías de los andamios de PGS tratados a 6, 12, 18, 24 y 30 minutos posterior al proceso de purificación por hinchamiento con cloruro de metileno y etanol, este proceso se llevó a cabo, con el fin de eliminar residuos de pPGS y pirrol como ya lo han reportado Moroder *et al* [153]. Esto sugiere que solo partículas de PPy-I quedan químicamente ancladas al andamio. Es claro la formación de partículas a partir de 12 minutos con tamaños del orden de $3.8 \pm 2.2 \mu\text{m}$, $5.4 \pm 2.0 \mu\text{m}$, $6.8 \pm 2.7 \mu\text{m}$, $8.2 \pm 5.4 \mu\text{m}$ para tiempos de 12, 18, 24 y 30 minutos respectivamente.

En la Figura 4.4 también se observa la distribución de tamaños de partículas, estos se encuentran en los intervalos de 2 a 11 μm , de 2 a 13 μm , de 2 a 17 μm y de 2 a 20 μm para tiempos de 12, 18, 24 y 30 minutos respectivamente. La polimerización de pirrol inducido por plasma en una atmósfera de aire produce un destello púrpura dentro de la cámara y el yodo un destello amarillo. La polimerización del pirrol se lleva a cabo mediante la producción de átomos libres, iones y otras partículas del plasma, que eliminan los átomos de hidrógeno del andamio, causando la formación de radicales libres que dan lugar a la polimerización del pirrol y su entrecruzamiento [106].

A nivel macroscópico, la presencia de las partículas de PPy-I en la superficie de los andamios de PGS se reflejó por un cambio en la coloración de éstos, de claro a oscuro, en función del tiempo de exposición 0 a 30 min; lo anterior fue debido a la incorporación del PPy-I y, a la presencia cada vez de mayores tamaños de partículas incrustadas de manera aleatoria sobre las superficies del andamio. En congruencia con este resultado, se ha reportado que la forma más estable del PPy-I en plasma son partículas esféricas formadas por entrecruzamiento, lo cual puede explicar la formación de partículas que encontramos en este trabajo a tiempos mayores de 12 minutos. Además, durante el proceso de entrecruzamiento y deshidrogenación, la libre rotación de los fragmentos del PPy puede producir superficies curvas a medida que se agregan más monómeros de pirrol al PPy [106], hasta que en la superficie se forman partículas de diferente morfología entre estrelladas y esféricas.

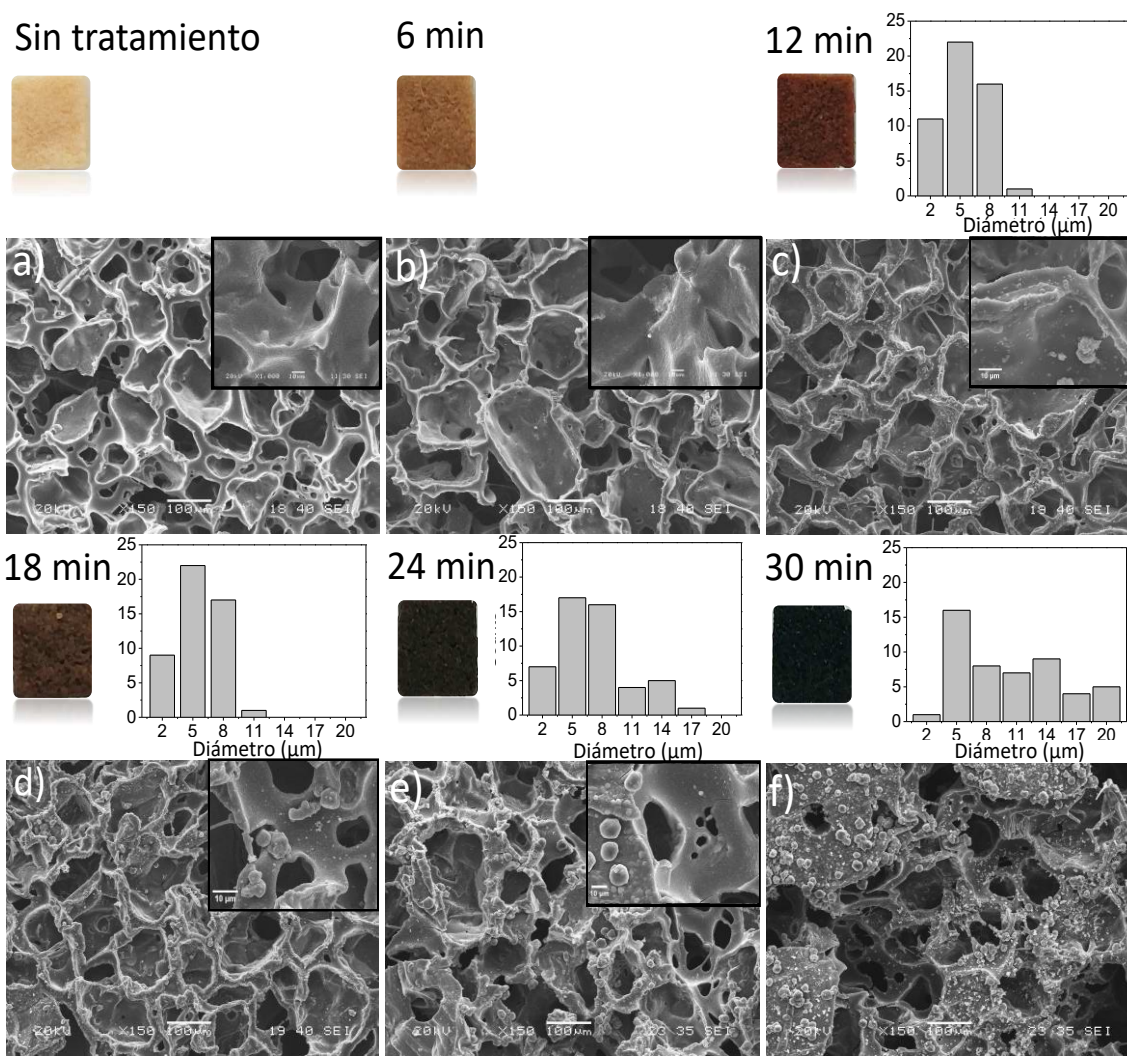


Figura 4.4 Micrografías MEB de andamios de PGS-PPy-I baja magnificación (150 x), alta magnificación (1000 x) y distribución de tamaños de partícula; a) sin tratamiento b) 6 min, c) 12 min, d) 18 min, e) 24 min y f) 30 min.

La Figura 4.5a muestra una mayor amplificación de las partículas que se forman en el andamio tratado a 30 minutos, se observa una disposición de empaquetamiento de esferas donde las partículas se presionan una contra la otra deformando ligeramente el perfil esférico. Interesantemente se observa una capa densa de película de PPy en algunos sitios del andamio con un espesor de aproximadamente 5 μm (flecha roja).

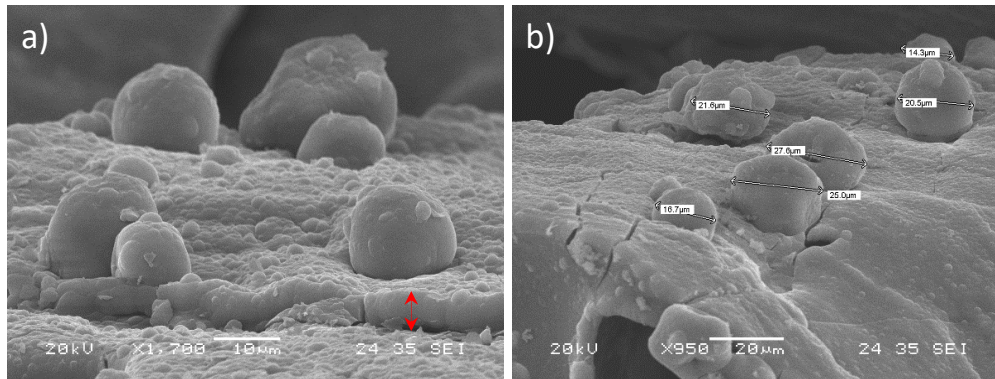


Figura 4.5 Micrografías MEB del andamio tratado a 30 minutos, a) 1700X b) 950X

4.2.3 Microscopía de fuerza atómica (AFM)

En la Figura 4.6 se muestra la topografía de las películas de PGS sin tratamiento y tratados a 6, 12, 18, 24 y 30 minutos, mientras que la tabla 4.2 muestra una muestra representativa de la distribución de los diámetros de las partículas generadas sobre la superficie de los andamios. Se observa un incremento en el intervalo de diámetros, debido a la agregación de partículas, aumentando así el tamaño de grano de PPy-I; resultados similares han sido reportados por Park *et al*, para una superficie polianilina (PANI) dopado con yodo [38].

La rugosidad es una característica importante durante el proceso de adhesión celular, es por esto, que se deben considerarse los cambios que se generan en el plasma con respecto a la rugosidad. El análisis por AFM se observa que la película sin tratamiento tiene una superficie lisa. Los andamios tratados 6, 12, 18, 24 y 30 minutos presentan una superficie rugosa, la cual se debe a las partículas de PPy-I formadas durante la exposición al plasma. En ellas se puede observar protuberancias y un crecimiento en morfología globular tipo fractal que ocurre a partir de la formación de sitios de nucleación [149, 154]. La rugosidad RMS de las películas se incrementa al aumentar el tiempo de tratamiento superficial, arrojando valores de $0.06 \pm 0.03 \mu\text{m}$, $0.12 \pm 0.07 \mu\text{m}$, $0.14 \pm 0.09 \mu\text{m}$, $0.22 \pm 0.09 \mu\text{m}$, $0.39 \pm 0.07 \mu\text{m}$ y $0.57 \pm 0.26 \mu\text{m}$ respectivamente. Estos valores de rugosidad son pequeños, si se considera la presencia de partículas esféricas de PPy-I. Sin embargo, es posible que el equipo AFM no tenga la capacidad de detectar la presencia de estas en un área de análisis de $10 \mu\text{m}^2$.

Estos valores de rugosidad obtenidos están dentro del intervalo de valores publicados para el PPy sintetizado en plasma sobre substratos de silicón [42]. Esto aporta evidencia de que el proceso de plasma con PPy-I afecta la topografía del PGS. Se ha reportado que, durante la irradiación de polímeros con enlaces éster como el PGS, con plasma, se puede formar radicales libres como R-COO*. Los monómeros de pirrol pueden reaccionar con estos radicales libres, produciendo enlaces químicos con los andamios PGS y, en consecuencia, los sitios de nucleación de las partículas PPy-I [129]. Por otro lado, la hidrofobicidad del PPy puede favorecer la formación de sitios de nucleación [115, 155].

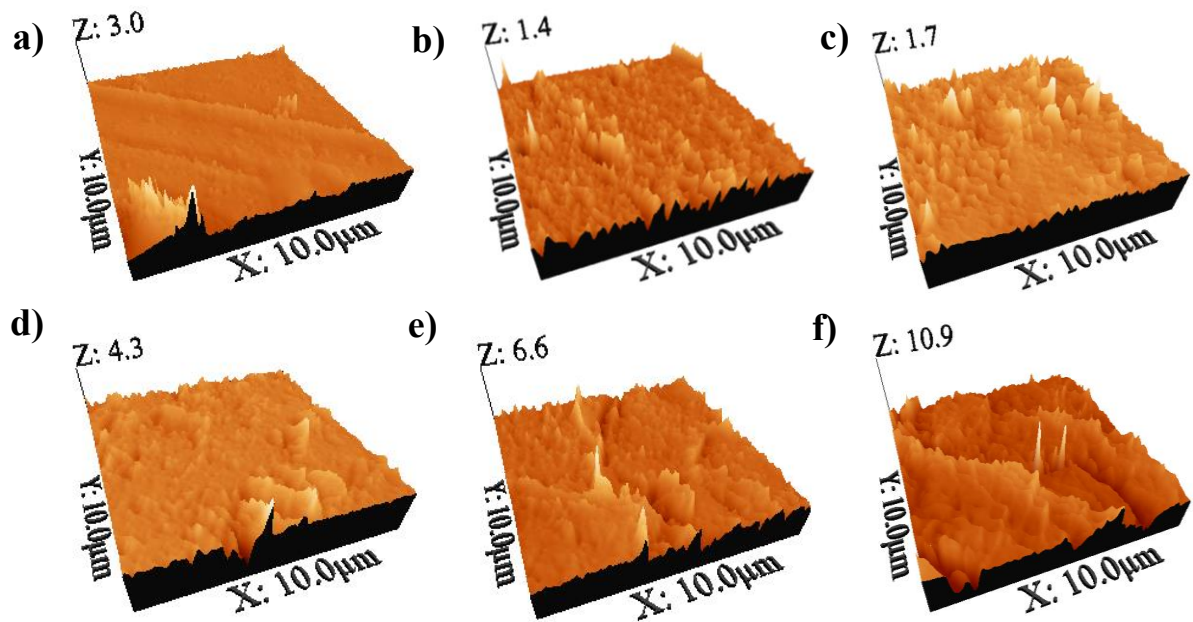
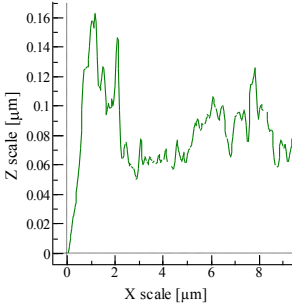
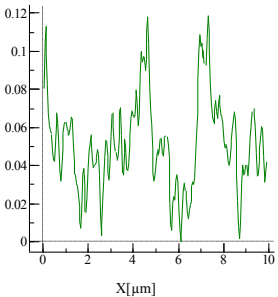
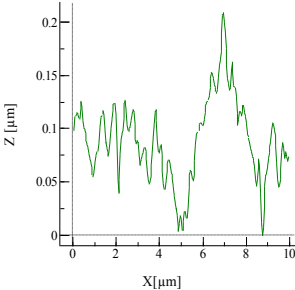
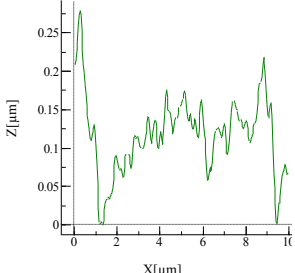
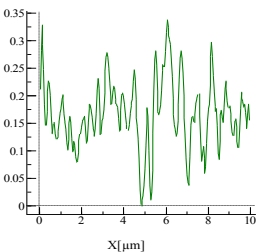
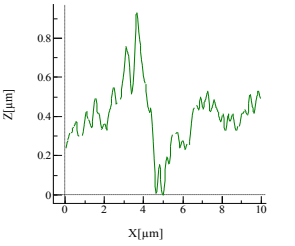


Figura 4.6 AFM películas; a) sin tratamiento; andamios tratados; b)6 min, c)12 min, d)18 min, e)24 min y f)30 min.

Tabla 4.2 Rugosidad (Rrms) y distribución de diámetros promedio de grano de las películas PGS tratadas con PPy-I.

	PGS	PGS-PPy 6 min	PGS-PPy 12 min
Rrms (μm) Promedio	$0.06 \pm 0.03 \mu\text{m}$	$0.12 \pm 0.07 \mu\text{m}$	$0.14 \pm 0.09 \mu\text{m}$
Distribución de partículas			
	PGS-PPy-I 18 min	PGS-PPy-I 24 min	PGS-PPy-I 30 min
Rrms (nm)	$0.22 \pm 0.09 \mu\text{m}$	$0.39 \pm 0.07 \mu\text{m}$	$0.57 \pm 0.26 \mu\text{m}$
Distribución de partículas			

4.2.4 Espectros FTIR de andamios tratados con PPy sin dopar.

La Figura 4.7 muestra los espectros FTIR de los andamios tratados con PPy, se observan bandas asociadas al PPy, lo que verifica la incorporación de las partículas. En los espectros también se observa que la banda ancha centrada en 1620 cm^{-1} del espectro del PPy atribuido a la contribución de los grupos C=C y NH se resolvió en dos bandas en los espectros de los andamios, debido a los fragmentos eliminados de las partículas PPy, que no se adhirieron químicamente al andamio después del proceso de purificación. También se observa que conforme se incrementa el tiempo de exposición en los andamios, la banda atribuida al grupo C=C en 1650 cm^{-1} se desplaza hasta 1638 cm^{-1} debido a la deshidrogenación del PPy, mientras que la banda en 1550 cm^{-1} atribuida al grupo amina secundaria NH y posible contribución del enlace amida II que surgió del enlace covalente entre el PPy y el PGS no se

observó desplazamiento. Estas señales en adición a las bandas en 2200 cm^{-1} atribuido al enlace $\text{C}\equiv\text{N}$, y al estiramiento de $-\text{NH}-$ en 3350 cm^{-1} se incrementan con el tiempo de exposición [143, 144].

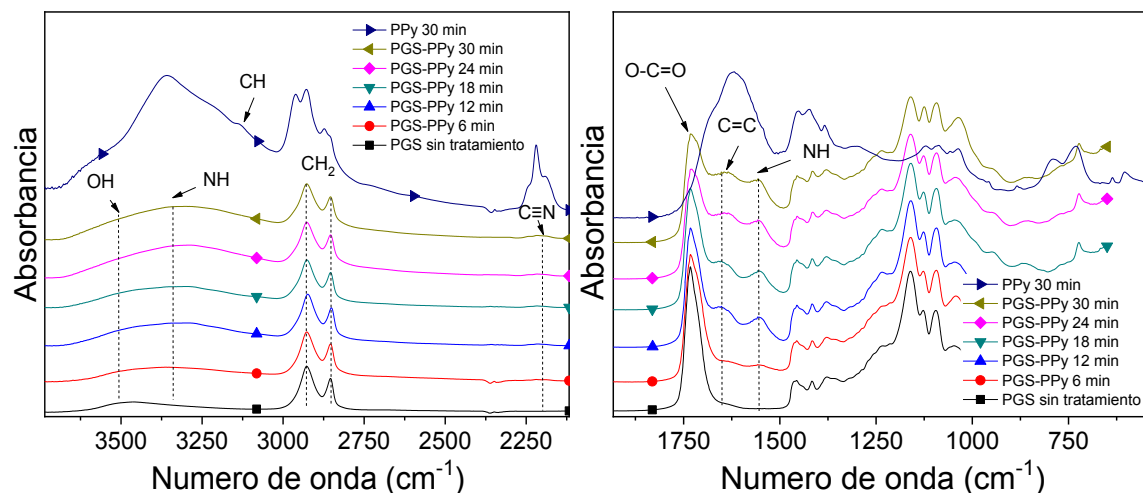


Figura 4.7 Espectros FTIR de andamios PGS tratados con PPy; a) región $3700\text{-}2200\text{ cm}^{-1}$ b) región $1900\text{-}450\text{ cm}^{-1}$

4.2.5 Espectros FTIR de andamios tratados con PPy-I

La Figura 4.8 muestra los espectros FTIR de los andamios tratados con PPy-I, se observa que conforme aumenta la cantidad de partículas PPy-I, el desplazamiento de la banda a 1650 cm^{-1} es mayor en comparación de los tratados con PPy, alcanzando un valor de número de onda de 1620 cm^{-1} . En presencia de yodo, se especula que este mayor desplazamiento se debió a la deshidrogenación y una contribución de las interacciones físicas y químicas del yodo con el PPy. En este sentido, radicales de I^\cdot pueden formarse por disociación homolítica de yodo, así como la influencia de luz [154, 156]. Estos radicales, pueden extraer átomos de hidrógeno de la estructura PPy, generando cambios vibracionales. Al igual que los andamios tratados con PPy, la banda centrada en 1550 cm^{-1} , no mostró ningún cambio, del mismo modo las bandas en 2200 cm^{-1} y 3350 cm^{-1} se incrementan con el tiempo de exposición [148, 154].

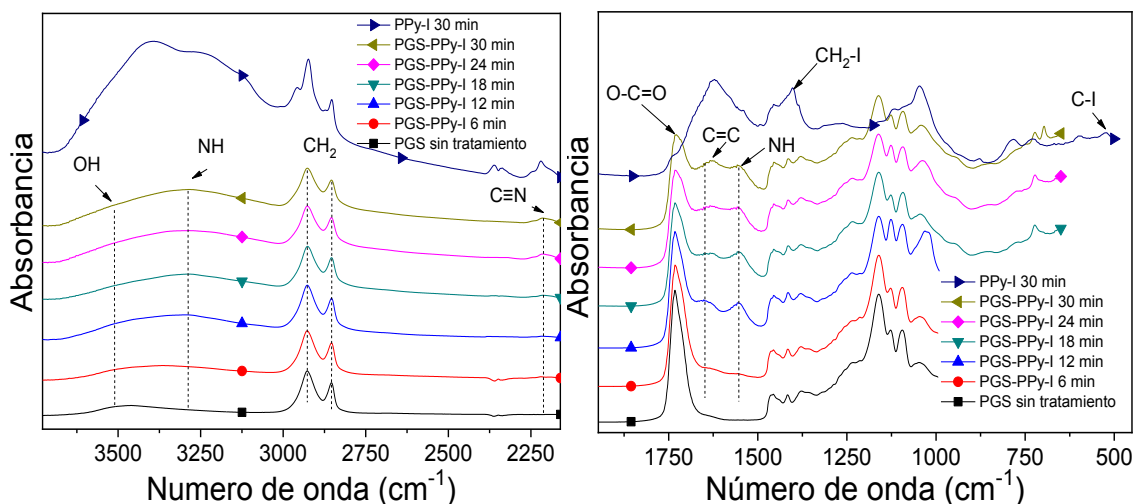


Figura 4.8 Espectros FTIR de andamios PGS tratados con PPy-I; a) región 3700-2200 cm^{-1} b) región 1900- 450 cm^{-1}

4.2.6 Espectroscopía Raman de los andamios tratados

En la Figura 4.9 se observan las señales del espectro Raman del andamio sin tratamiento y los andamios tratados a 6, 12, 18, 24 y 30 minutos. Los espectros de los andamios tratados son similares a los reportados para el PPy dopado con yodo sintetizado electroquímicamente y químicamente [157-159]. Se observan un pico principal en 1598 cm^{-1} atribuido al estiramiento simétrico del enlace C=C y, otro pico en 1579 cm^{-1} , asociado con otro modo de vibración del enlace C=C del anillo aromático de PPy [160]. Es claro que, con el tiempo de exposición, ocurre un desplazamiento de la banda de 1586 cm^{-1} a 1598 cm^{-1} , debido a defectos de sustitución de los anillos de la estructura del PPy, que puede ocasionar diferentes modos de vibración. Por otro lado, es claro que los espectros presentan todos sus picos ubicados ligeramente por debajo de 1600 cm^{-1} , esto probablemente indica el dominio en su forma reducida del PPy [161].

Se observa dos picos localizados en 1380 cm^{-1} y 1330 cm^{-1} atribuido al estiramiento de los enlaces C-N y C-C respectivamente, mientras que el pico en 1050 cm^{-1} es atribuido a un modo de deformación del anillo C-H asociado a la estructura del PPy. El pico en 980 cm^{-1} es atribuido a compuestos portadores de carga N^+ (polarón) y solo se observaron para los

andamios tratados 18, 24 y 30 minutos. La incorporación de yodo incrementa los radicales cationes de nitrógeno [159, 162, 163]. Por ejemplo, Fan *et al*, demostraron que la incorporación in situ del yodo en el PPy acelera drásticamente la generación de radicales cationicos de nitrógeno [159, 164], alcanzado valores de 28% detectado por XPS. En este contexto, en los espectros de los andamios, la intensidad del pico atribuido al polarón N^+ es casi constante para tiempos de tratamiento de 18 y 24 minutos, esto probablemente, indica que la interacción entre el yodo y el PPy se mantiene constante, pero para el tratado a 30 minutos se incrementa. Por otro lado los grupos carbonilo O-C=O del PGS pueden actuar como defectos causando interrupciones en la conjugación π y actuando como grupos de extracción de electrones, inhibiendo transferencia de cargas lo que probablemente impide la detección de los picos, en tiempos de 6 y 12 minutos, similar a lo que ocurre para el Polietileno Tereftalato (PET) y el algodón recubierto con PPy [165, 166]. Además de esto los picos detectados para tratamientos de 18, 24 y 30 minutos no es claro a 6 y 12 minutos.

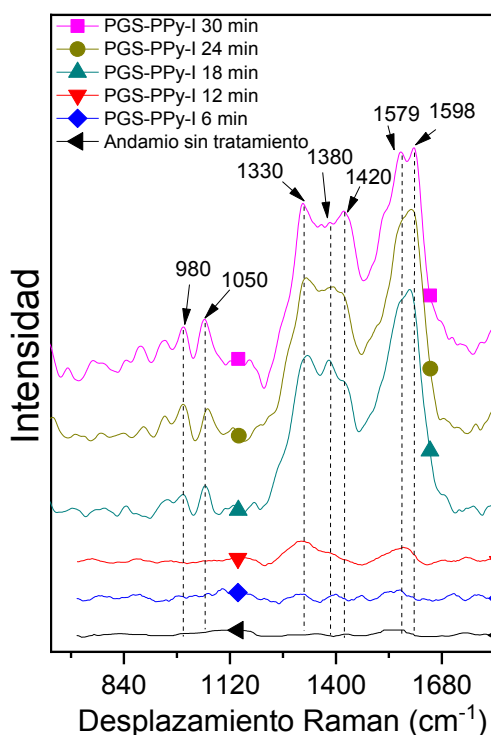


Figura 4.9 Espectro Raman de andamios PGS tratados con PPy-I

4.2.7 Espectroscopia Fotoelectrónica de rayos X (XPS).

La Figura 4.10 muestra los espectros en modo de reconocimiento XPS, se detectaron cuatro picos a las energías de enlace de 284.8 eV, 400 eV, 531 eV y 630 eV, correspondientes a C1s, N1s, O1s y I3d respectivamente, mientras que a 875 eV y 930 eV se observan picos atribuidos a I3p_{3/2} y I3p_{1/2} respectivamente. La incorporación de yodo al andamio tiene como objetivo aumentar la capacidad de transferencia de cargas eléctricas del PPy, lo cual ha sido previamente reportado [111, 114, 147]. Paosawatyanong *et al*, sintetizó PPy por plasma, logrando incrementar la conductividad eléctrica cuando es dopado con yodo [144], lo cual es característica importante, debido a que muchas de las funciones principales en las células están controladas por señales eléctricas [120].

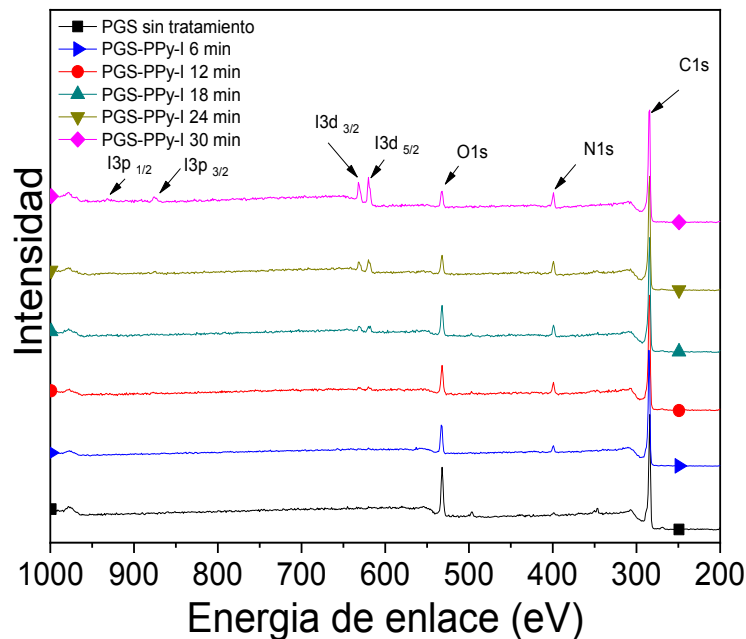


Figura 4.10 Análisis en modo de inspección de los andamios PGS-PPy-I; a) sin tratamiento b) 6 min c) 12 min d) 18 min e) 24 min f) 30 min

Los resultados del análisis elemental de la superficie de los andamios sin tratamiento y tratados con PPy-I determinado por XPS se muestra en la Tabla 4.3. Se observa un claro decremento en el oxígeno y un incremento del yodo y nitrógeno. Sin embargo, también se observó una disminución de nitrógeno en el andamito tratado 24 minutos en comparación del

tratado a 18 minutos, debido probablemente, a la degradación de C-N en un ambiente volátil del plasma de alta energía [144].

Tabla 4.3 Porcentajes atómicos del carbono, oxígeno, nitrógeno y yodo en los andamios sin tratamiento y tratados.

Tratamiento	Atómico %				C/N
	Carbono ±1.00	Oxígeno ±1.00	Nitrógeno ±1.00	Yodo ±1.00	
Sin tratamiento	83.4	16.2	-----	-----	
6 min	85.3	9.6	4.8	0.1	17.7
12 min	85.8	8.7	5.2	0.2	16.5
18 min	87.8	5.7	6.0	0.3	14.6
24 min	87.8	6.0	5.7	0.5	15.4
30 min	87.0	4.9	7.0	0.9	12.4

Las señales del C1s del espectro XPS correspondientes a los andamios sin tratamiento deconvolucionaron en 3 señales de carbono (ver Figura 4.11a.) La primera se observa a 284.7 eV atribuida al enlace C-C, la segunda a 286.8 eV atribuida al enlace C-O-C, y la tercera se observa a 289 eV, atribuida al grupo éster O-C=O. La deconvolución de los espectros de C1s de los andamios de PGS tratados presentó un pico adicional ubicado a 288,2 eV, que se asoció con el grupo C≡N (Figura 4.11 b-f) [167].

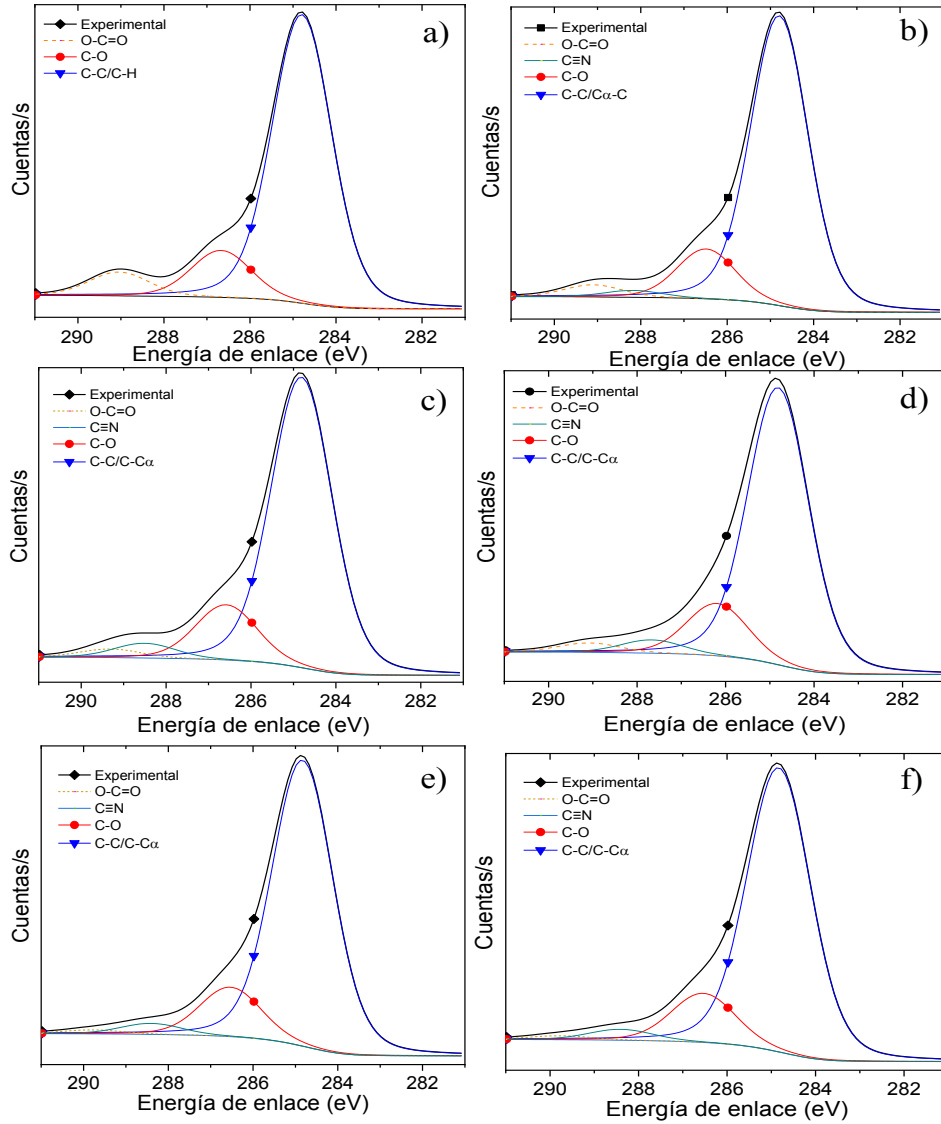


Figura 4.11 Los espectros de alta resolución de la señal C1s deconvolucionados de los andamios de PGS-PPy-I a) sin tratamiento b) 6 min c) 12 min, d) 18 min, e) 24 min, f) 30 min

La tabla 4.4 muestra el porcentaje de área de las deconvoluciones de la señal C1s. Se observaron cambios con el incremento en el tiempo de exposición; el porcentaje del área del enlace C≡N a 287.8 eV aumenta, derivado de la ruptura del anillo aromático del pirrol y el pico del éster O-C=O disminuyen, debido al recubrimiento del PPy-I. Estos resultados se correlacionan bien con los resultados observados en los espectros FTIR [167, 168]. Mientras que el incremento en el contenido del enlace C-C a 284.8 eV se puede atribuir al grupo C=C_α-N derivado de la posición del carbono en la estructura de PPy [169-171].

Tabla 4.4 Porcentaje atómico (%) de las diferentes señales de carbono en los andamios PGS, sin tratamiento y tratado con PPy-I

	Porcentaje atómico de carbono (%)			
	O-C=O	C≡N	C-O-C	C-C/C-H/C-C _α
	289 eV	288.2 eV	286.7 eV	284.8 eV
Sin tratamiento	6.8	0.0	13.8	79.3
6 min	3.8	2.4	14.1	79.2
12 min	3.5	3.5	13.3	79.6
18 min	2.5	3.9	13.8	79.5
24 min	2.6	3.4	13.4	80.7
30 min	1.2	4.1	12.3	81.9

La Figura 4.12 muestra el espectro de alta resolución de la señal N 1s de los andamios tratados con PPy-I; estas señales se deconvolucionaron en 4 componentes: las señales a 398 eV, 399.7 eV, 400.6 eV y 402.2 eV fueron atribuidos a los enlaces iminas =NH, aminas -NH, C-N y a especies portadora de carga N⁺ respectivamente [107, 147, 170]. La señal N1s muestra un aumento de NH y N⁺, esto último debido al incremento del triyoduro I³⁻, derivada de la oxidación del PPy e interacción p-π con el yodo, similar a la polimerización química del PPy-I [107]. Sin embargo en plasma, los porcentajes bajos 3.6%, 4.4%, 5.3%, 5.3%, 6.4% de N⁺ observados indican, una débil interacción del yodo con el nitrógeno del PPy, similar a lo que ocurre en polimerización in situ [146, 159].

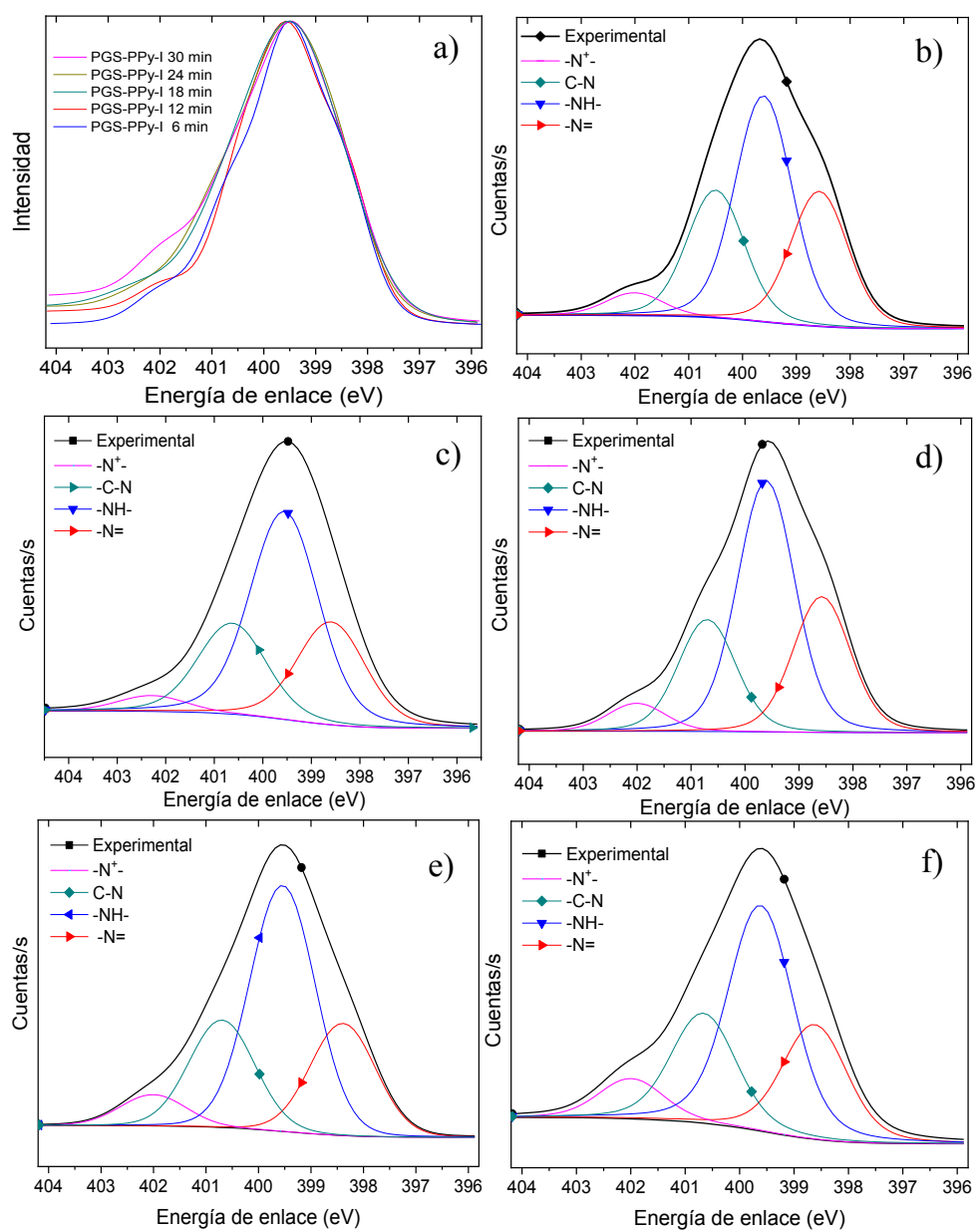


Figura 4.12 Espectros de alta resolución N1s XPS de los andamios de PGS tratados con PPy-I; a) curvas experimentales b) 6 min, c) 12 min, d) 18 min, e) 24 min, f) 30 min

Para la señal I3d (Figura 4.13), dos picos representativos fueron observados a 618.6 eV y 629.8 eV correspondientes a (I3d_{5/2}) y (I3d_{3/2}). Para el pico más intenso I3d_{5/2}, dos picos se pueden ajustar; el primero con un máximo de 617.8 eV es atribuido al enlace C–I y un segundo pico con un máximo en 620.5 eV se puede atribuir al enlace N–I, al triyoduro I₃⁻ y pentayoduro I₅⁻ adsorbido [172], debido a la transferencia de carga de electrones π desde la estructura del PPy a los átomos de yodo [143, 146, 156, 173-175]. El incremento de la señal de los poliyoduros se debe, probablemente, al exceso de yodo elemental I₂ que reacciona con especies I⁻, I₃⁻ formando pentayoduros I₅⁻ y poliyoduros unidos al PPy. La evolución de la composición química de los andamios PGS tratados se estimó de las deconvoluciones de alta resolución de las señales N1s y I3d (tabla 4.5)

Tabla 4.5 Porcentaje atómico (%) de las diferentes señales de nitrógeno en andamios de PGS tratados.

Tratamiento	Porcentaje atómico de nitrógeno (%)				Yodo (%)	
	-N ⁺ -	-C-N-	-NH-	=NH-	N-I, I ⁵ ,I ³⁻	C-I
	402.2 eV	400.6 eV	399.6 eV	398.7 eV	620.5 eV	618.6 eV
6 min	3.6	25.0	43.6	27.8	22.87	77.1
12min	4.4	24.9	44.2	26.4	47.5	52.5
18min	5.3	21.3	47.6	25.7	57.9	42.0
24min	5.2	19.0	51.8	23.8	71.9	28.0
30min	6.4	19.0	50.2	24.4	80.0	19.8

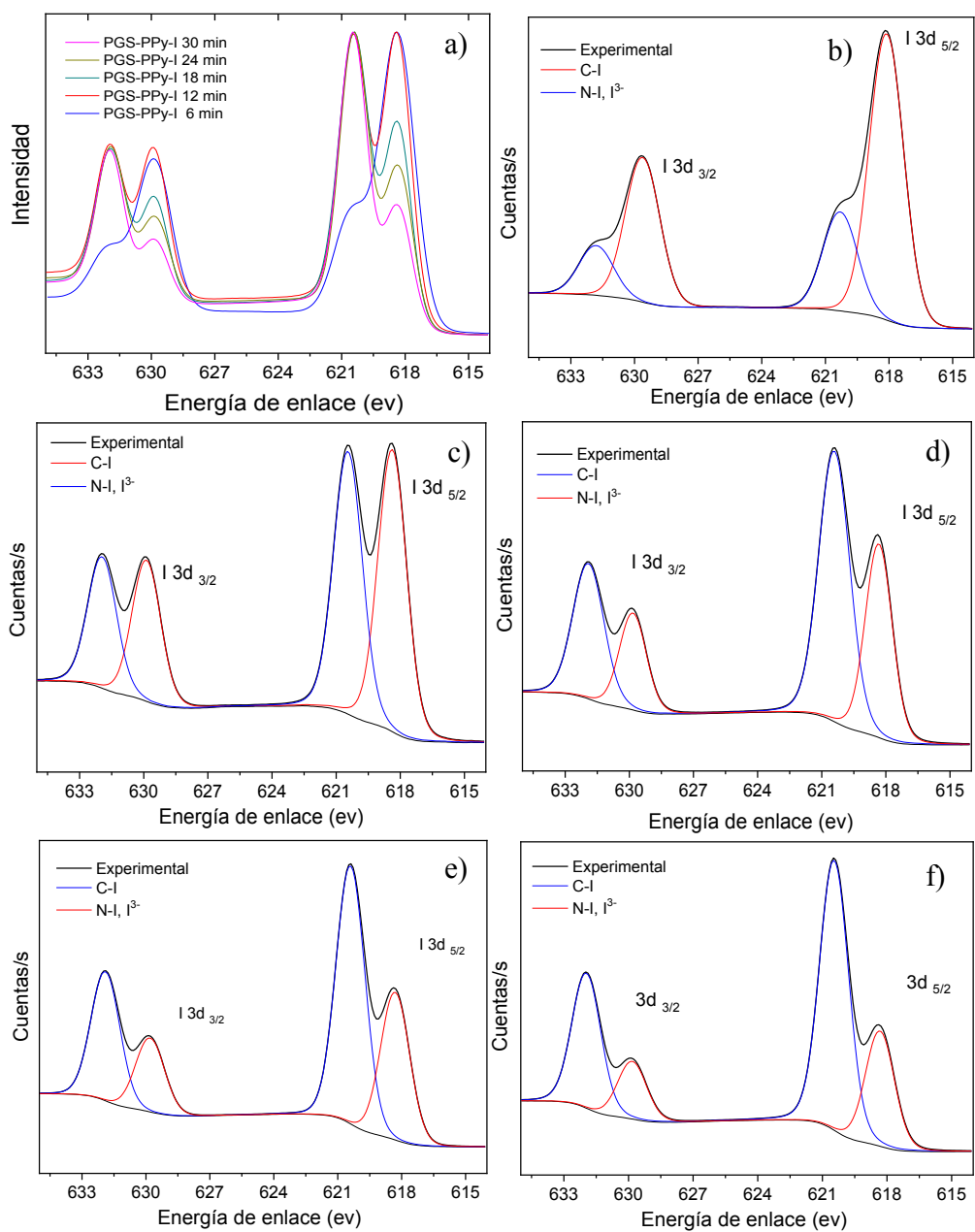


Figura 4.13 Los espectros de alta resolución I3d XPS de los andamios tratados; a) curvas experimentales, b) 6 min, c) 12 min, d) 18 min, e) 24 min, f) 30 min.

4.2.8 Angulo de contacto

El ángulo de contacto en agua es una manera simple de medir el carácter hidrofílico de la superficie de los materiales. En la Figura 4.14 a se observa los valores de ángulos de contacto de las películas PGS sin tratamiento y tratados con PPy. La película de PGS sin tratamiento muestra un valor de $58\pm 4^\circ$, similar al reportado por Shi *et al*, en andamios fabricados de PGS [59, 65]. Para las películas tratadas con PPy se observa una tendencia a disminuir la hidrofiliidad en función del tiempo de exposición. Sin embargo los valores de ángulo de contacto son inferiores a 90° , esto indica que todas las películas tratadas con PPy son intrínsecamente hidrofílicas, ya que los grupos aminos NH e iminas =NH- con carácter polar del PPy forman fácilmente interacciones de hidrogeno con el agua [102].

La Figura 4.14 b muestra los ángulos de contacto de las películas tratadas con PPy-I, a un tiempo de 6 minutos el ángulo de contacto se incrementa a $62\pm 5^\circ$, este pequeño incremento de la hidrofobicidad es atribuido al incremento de grupos hidrofóbicos C-C α de la estructura aromática y/o fragmentos del PPy, como C \equiv N depositadas en la superficie de la película como una densa red entrecruzada de PPy [170]. Las películas tratadas a 12, 18, 24 y 30 minutos disminuye ha valores de $51\pm 4^\circ$, $44\pm 4^\circ$, $40\pm 4^\circ$ y $39\pm 3^\circ$ respectivamente. Se observa una diferente tendencia en comparación de las películas tratadas con PPy, probablemente debido a la naturaleza higroscópica del yodo [176]. También es probable que la rugosidad aporte en la disminución de ángulos de contacto obtenido cuando se incrementa del tiempo de exposición

Jiménez *et al* demostraron que el PPy-I tiene afinidad con soluciones de concentración de sal similares a los tejidos humanos con altas posibilidades de interactuar con los tejidos celulares [86]. Por otro lado, Tejada *et al*, reportaron que potencias de 35 W y menores son adecuadas para obtener superficies hidrofílicas [177].

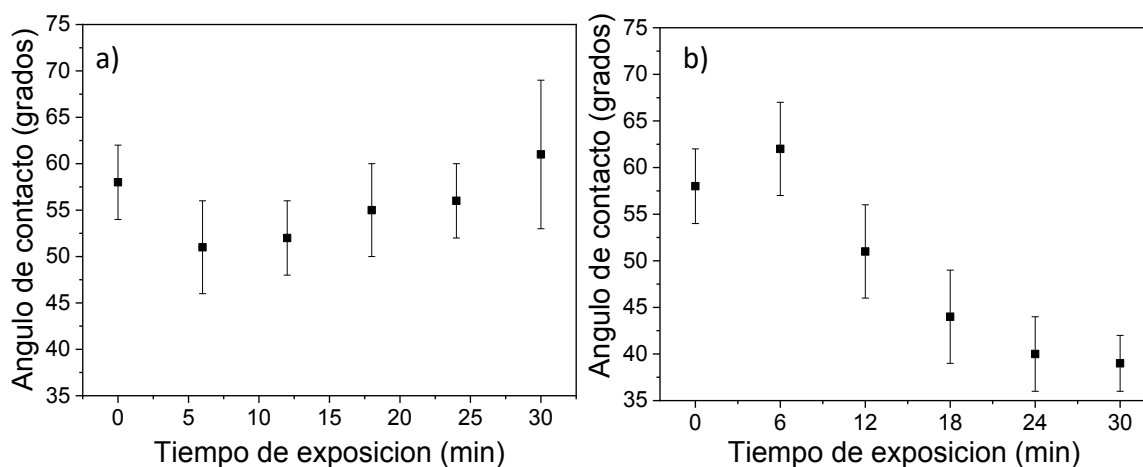


Figura 4.14 Variación del ángulo de contacto de las películas tratadas con; a) PPy-I y b) PPy.

4.2.9 Ensayos mecánicos a tensión.

Las propiedades mecánicas de los andamios de PGS dependen de varios factores como la porosidad, la relación molar de los monómeros, el porcentaje de reticulación, especialmente en andamios con una alta relación área/volumen, etc., La Figura 4.15a se muestra la variación del módulo de Young de los andamios sin tratamiento y tratados en función del tiempo de exposición sin acondicionamiento en agua destilada. El andamio sin tratamiento tiene un valor de 87.8 ± 12.2 kPa, valor que está dentro del intervalo reportado por Rai *et al* para este material [67]. La elasticidad del PGS es resultado del entrecruzamiento de los grupos hidroxilo y carboxilo en el pPGS a través del proceso de esterificación. El módulo de Young de los andamios tratados mostró una tendencia ascendente a medida que el tiempo de exposición se incrementó. Los valores fueron de 96.0 ± 8.4 kPa, 100.5 ± 8.9 kPa para 6 y 12 minutos, los cuales no mostraron cambios significativos entre ellos, el tratamiento a estos tiempos solo crea partículas discretas en la superficie del andamio, por lo tanto, es posible postular que el PGS gobierna las propiedades mecánicas de los andamios. Sin embargo, los andamios tratados durante 18, 24 y 30 minutos exhibieron un aumento significativo en el módulo de Young, en comparación con los andamios no tratados. Este comportamiento se debe, probablemente al entrecruzamiento de la superficie de los andamios PGS y a las partículas PPy-I. Es posible que las partículas PPy-I actúen como una restricción física durante la deformación por tracción de los andamios PGS, ya que es una molécula rígida.

Por el contrario, el esfuerzo máximo mostró una tendencia a la baja a medida que aumentaba el tiempo de exposición.

La pérdida de la resistencia máxima (Figura 4.15 b) de los andamios tratados puede deberse a la concentración de esfuerzos causada por el exceso de partículas PPy-I. Los valores de esfuerzo máximo fueron 35 ± 3 kPa, 30 ± 4 kPa, 31 ± 4 kPa, 29 ± 3 kPa y 30 ± 4 kPa para tiempos de 6, 12, 18, 24 y 30 min, respectivamente, mientras que la deformación más baja obtenida a la rotura fue de 0.35, que corresponde a un tiempo de exposición de 30 minutos de tratamiento con plasma.

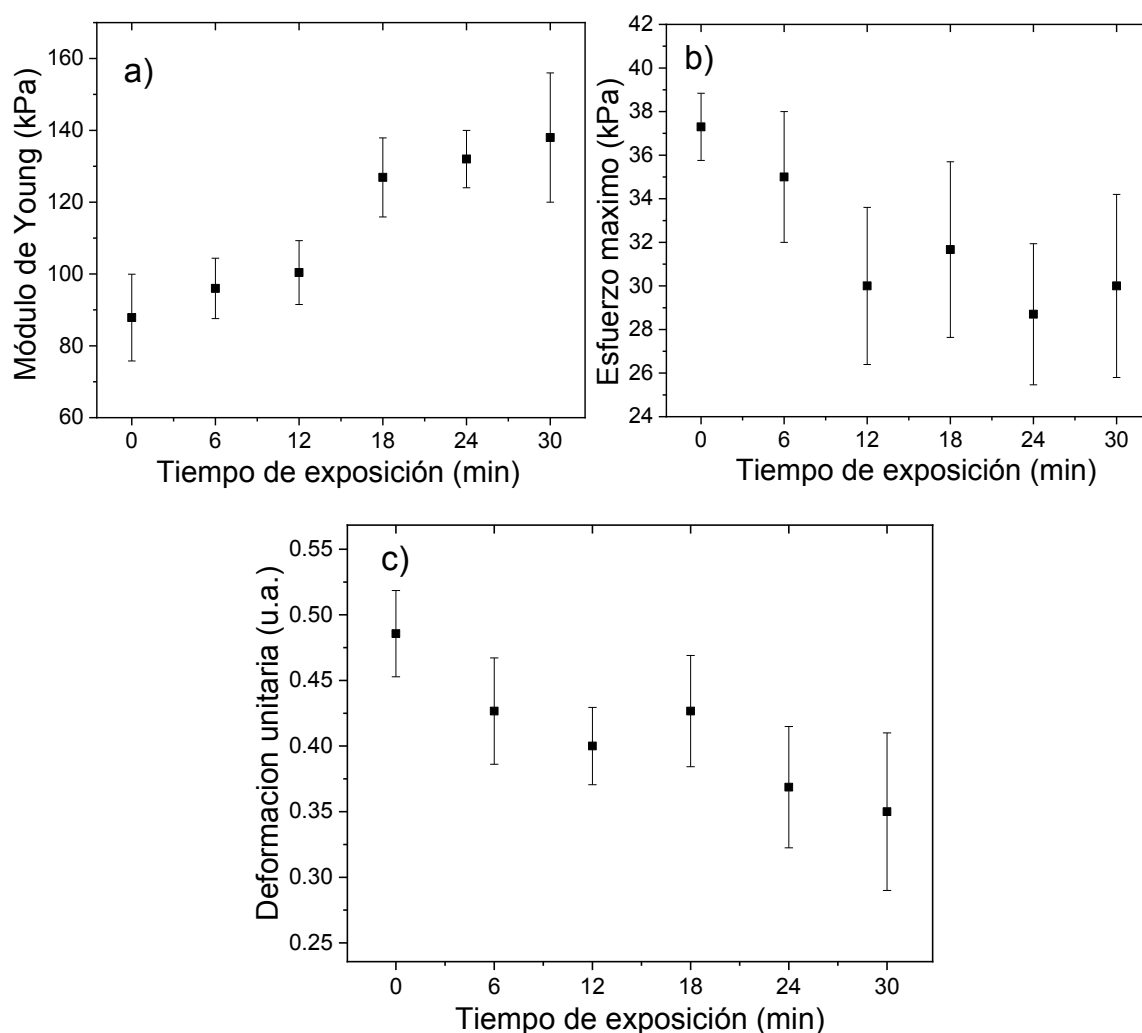


Figura 4.15 Propiedades mecánicas de los andamios PGS tratados (n=4, $p < 0.05$) prueba Tukey's ANOVA de una vía a) Módulo de Young b) esfuerzo máximo c) deformación unitaria

4.3 Biocompatibilidad del andamio de PGS tratado con PPy-I

4.3.1 Cultivo y expansión de hDPSCs.

Se logró aislar y cultivar exitosamente células troncales a partir de muestras de tejido pulpar. En los explantes de pulpa dental sana de la Figura 4.16a, se comenzó a observar la migración de las células de explante y proliferación de hDPSCs a los 8 días de cultivo y, al día 14, las células presentaron una confluencia de 70-80%. Después de esto fueron tripsinizadas y expandidas en un nuevo cultivo. La Figura 4.16b muestra que las células obtenidas de la pulpa dental mostraron morfología fibroblastoide y adherencia a la superficie plástica de la placa de cultivo. Se utilizaron hDPSCs al pasaje 5 para realizar la prueba de proliferación celular y de citotoxicidad.

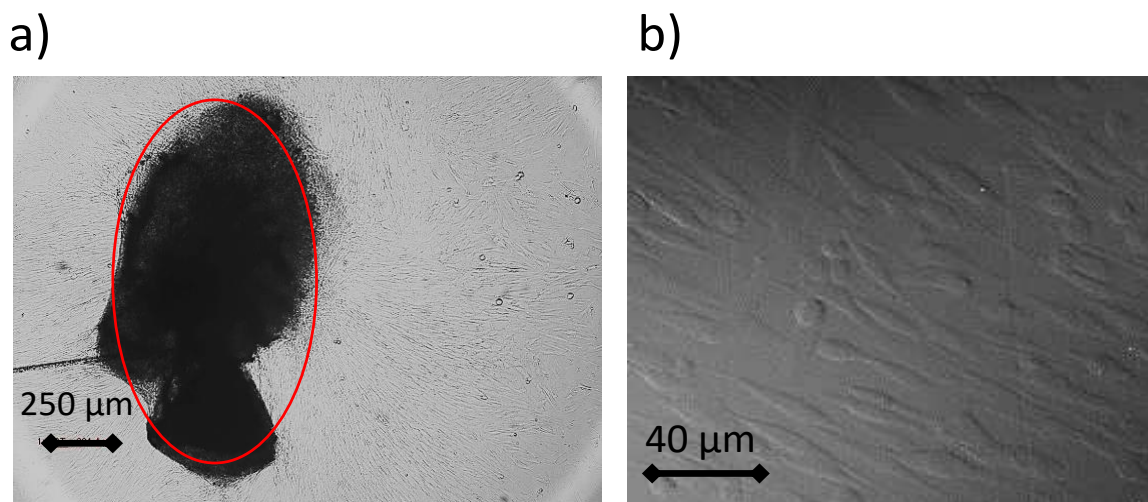


Figura 4.16 a) hDPSCs migrando del explante Magnificación 4 x. En el cultivo se destaca con un círculo rojo el tejido pulpar b) hDPSCs observadas con microscopio confocal.

4.3.2 Caracterización de la población hDPSC por citometría de flujo

La Figura 4.17 muestra la expresión fenotípica de las hDPSCs, las cuáles dieron positivo para los antígenos de células troncales mesenquimales, de acuerdo con el análisis de citometría de flujo. Se observa que el 51.8 % de las células fueron positivas a los marcadores troncales CD90, 82.4 % hacia el marcador CD73 y 57.9 % al CD105. Además, el 99.9 % de las células fueron negativas al marcador hematopoyético CD34 y una baja expresión de 15.2 % a CD45. La expresión total a anticuerpos de fenotipo troncal mesenquimal fue de 72.1 %. Los

resultados muestran que a partir de tejido pulpar es posible aislar células, utilizando métodos de explante, después de un periodo de cultivo de 14 días. Esto concuerda con los resultados de otros estudios donde utilizan células desde los días 5 a 15 de cultivo celular a partir de explantes de tejido pulpa [178].

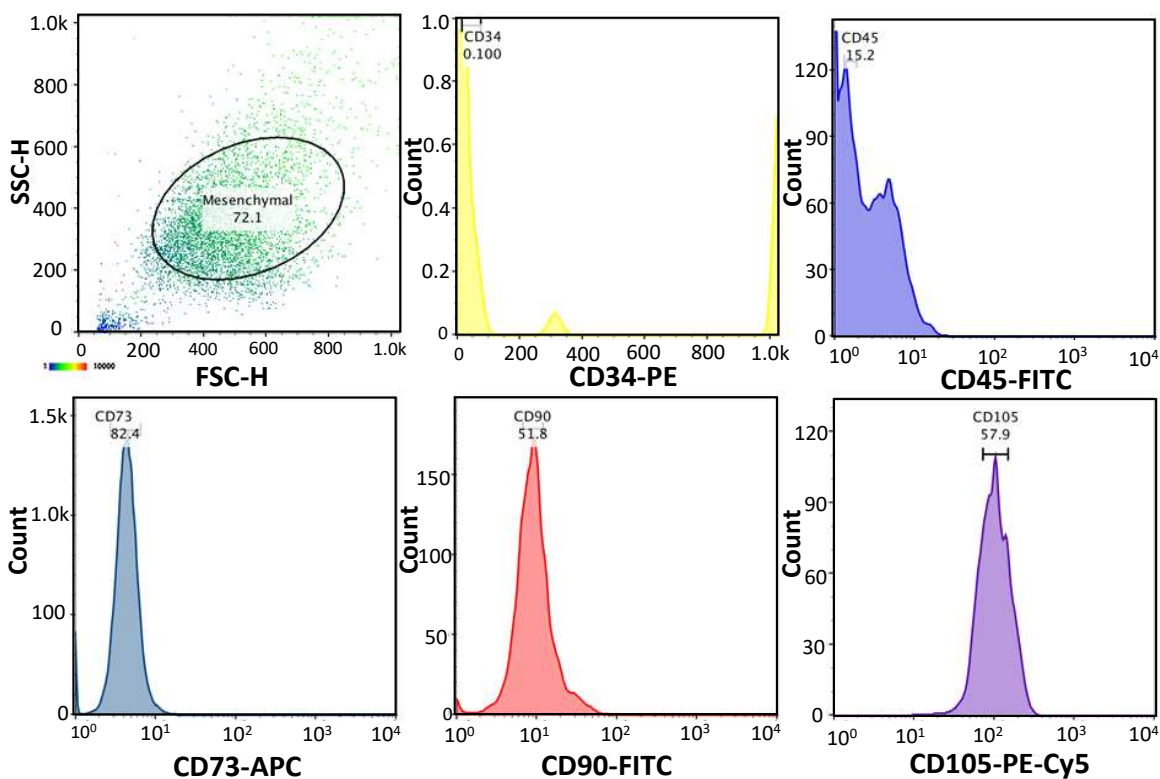


Figura 4.17 Análisis de citometría de flujo para marcadores de células troncales mesenquimales y hematopoyéticas (CD34, CD45, CD73, CD90 y CD105).

4.3.3 Proliferación celular de andamios tratados con hDPSCS.

En la Figura 4.18 se muestra que la proliferación celular (medido como absorbancia) de las células en contacto directo con andamios para el PGS sin tratamiento fue de alrededor del 0.32 ± 0.05 el primer día, 0.39 ± 0.07 el segundo día, y se incrementó hasta un 0.54 ± 0.04 para el día cinco. Los resultados mostraron una mejor proliferación celular en los andamios PGS tratados a tiempos cortos, en comparación con los andamios no tratados. En este sentido los andamios PGS tratados 6 minutos con PPy-I exhibieron una mayor absorbancia 0.66 ± 0.07 después de cinco días de crecimiento celular, lo que representa un incremento del 20% en

comparación con el andamio no tratado. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$). Se ha reportado que la mayoría de las membranas celulares tienen carga negativa; ya que el pH isoeléctrico de las membranas es menor que el pH fisiológico, así, las partículas cargadas positivamente con N^+ pueden ayudar a adherir las células al andamio. Además, las funcionalidades de aminas NH en biomateriales estimulan la adhesión celular al proporcionar cargas positivas en las superficies en condiciones fisiológicas [15] [121] [19, 106, 111].

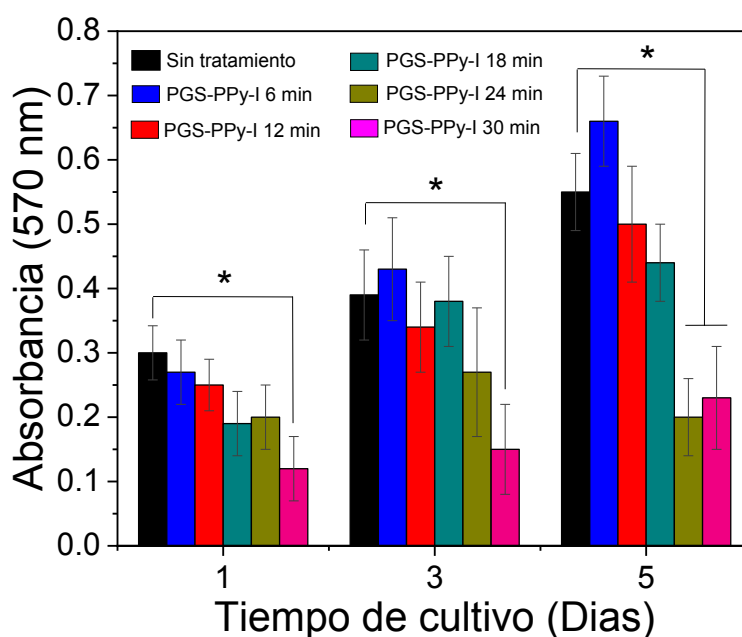


Figura 4.18 a) Viabilidad celular (método de contacto directo) de hDPSCs después de 1,3 y 5 días en andamios tratados con PPy-I. ANOVA Tukey's de una vía * $p < 0.05$.

En términos de viabilidad celular, el andamio tratado durante 6 minutos es el que promovió una mayor viabilidad celular al día 5 de cultivo celular $92.2 \pm 9\%$ en contacto directo con respecto al control positivo, por lo que de acuerdo a la norma ISO 10993 [72], este material puede ser considerado como no citotóxico. En este contexto, un tiempo de exposición corto (6 minutos) a un proceso de modificación de plasma permite la incorporación de grupos funcionales como el N-H, C-N de PPy-I, a pesar de no se observó la formación de las partículas PPy. Además, un tiempo de exposición corto también permite la conservación de

los enlaces C-O y O-H del PGS. Estos grupos funcionales son comunes en el cuerpo humano y cuando se agregan a cualquier biomaterial mejoran las propiedades de biocompatibilidad de la superficie [102]. Sin embargo, se demostró claramente que la proliferación celular depende de la concentración de las partículas PPy-I en la superficie del andamio PGS.

También se observa que conforme aumenta el tiempo de exposición de 6 a 30 min, la proliferación celular disminuye; esta tendencia se aprecia a los 1, 3 y 5 días. Los andamios tratados durante 6, 12, 18 y 24 minutos no muestran diferencias significativas tanto para el día 1 y 3 en comparación del andamio sin tratamiento ($p > 0.05$). Pero al quinto día, la proliferación celular de las hDPSCs disminuye significativamente a partir del tratamiento con 24 minutos. Estos resultados, puede parecer inesperado si se considera que un aumento en el contenido de PPy debería conducir a un aumento en la biocompatibilidad del andamio, como se ha reportado en [111]. Sin embargo, existe una alta probabilidad de que grupos NH no estén fácilmente disponibles en la superficie de las partículas PPy-I para interactuar con las hDPSC. En este sentido Castano *et al*, realizaron deposición química de PPy con diferentes concentraciones de pirrol en placas de poliestireno para cultivo de tejidos (TCP) y encontraron que la proliferación celular de células troncales mesenquimales fue mayor a concentraciones bajas de pirrol [179]. El tratamiento con plasma de polipirrol no es tóxico, pero probablemente disminuye la adhesión celular en los andamios después de 18 minutos. Otro factor que disminuye la proliferación celular al quinto día, puede ser debido a la rápida proliferación de las hDPSCs y que probablemente exista una saturación la superficie de contacto ente el material y las células, lo que puede ocasionar muerte celular, aunque para afirmar esto, es necesario otro tipo de ensayos donde se controle el número de células iniciales en los ensayos.

Sánchez-Pech *et al*, reportaron tendencias similares, cuando estudiaron la modificación de andamios de PCL/PLGA con PPy (sin dopaje) utilizando diferentes tiempos de exposición a los tratamientos con plasma. Llegaron a la conclusión de que los andamios PCL/PLGA tratados con plasma de PPy durante 25 y 30 minutos exhibieron citotoxicidad en comparación con los andamios tratados durante 15 minutos [132]

4.3.4 Morfología de las hDPSCs en contacto directo con andamios PGS

La adhesión celular es el proceso por el cual las células forman contactos entre sí o con el andamio a través de complejos proteicos especializados. Las hDPSCs pueden interactuar con grupos COOH, OH y NH que están presentes en la matriz extracelular a través de adherencias focales [118]. En este sentido se probó la capacidad de las superficies modificadas con PPy-I para mantener la adhesión. Se dejó que las hDPSCs se adhieran a los andamios durante 24 horas y se observó la morfología de las células. En la Figura 4.19 el andamio sin tratamiento se observan solo células en forma de esferas, mientras que el andamio tratado 6 minutos se observan algunas hDPSCs alargadas, lo que indica el éxito inicial de la interacción celular con el andamio. Estas hDPSCs adheridas y alargadas (flechas de color amarillo) son el resultado de interacciones del OH y NH⁺ presentes en la composición química de los andamios que se forman durante el tratamiento con el plasma [118, 119].

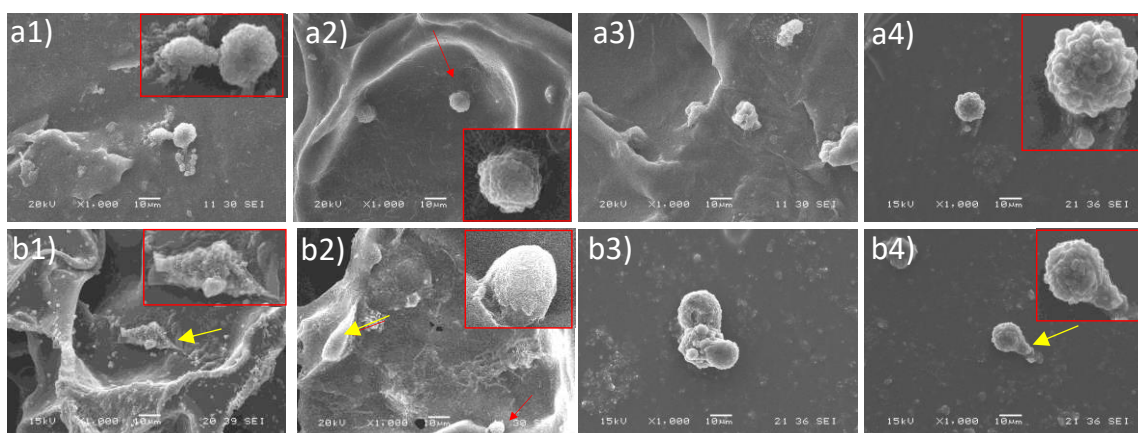


Figura 4.19 Micrografías MEB de las células en contacto con el andamio; a1-a4) sin tratamiento, b1-b4) tratado a 6 min.

4.3.5 Citotoxicidad LIVE/DEAD de las hDPSC en medios acondicionados de los andamios tratados.

Las micrografías en la Figura 4.20 muestran que las células están distribuidas uniformemente en la placa de cultivo celular. La expresión de células verdes (vivas) y células rojas (muertas) indica que la proliferación celular continuó en la placa de cultivo. Para los extractos de los

andamios PGS-PPy tratados a 6, 12, 18 y 24 min hay mayor cantidad de células vivas sin cambio en la morfología y con muy pocas células muertas. Para los andamios PGS tratados con PPy-I, la presencia de células muertas comenzó a aparecer en el extracto del andamio PGS cuando la exposición al tratamiento con plasma alcanzó los 18 minutos y fueron más evidente la muerte celular en el extracto de los andamios tratados a 24 y 30 minutos. También se observó que el número de células muertas aumentó a medida que se incrementó el tiempo de exposición al plasma en los andamios; indicando que la citotoxicidad aumenta de manera directamente proporcional al tiempo de exposición. Se observa que existe una diferencia de tamaño entre las células vivas y las muertas, mientras las células muertas aparecen redondeadas y teñidas de rojo (indicativo de muerte celular), las células vivas son más grandes e incluso han adquirido una morfología alargada. La proporción de células vivas/muertas fue de 15, 13, 4 y 2 para los tiempos de tratamiento de 6, 12, 18 y 24 minutos respectivamente.

Este hallazgo sobre la citotoxicidad puede atribuirse a una liberación de yodo al medio de cultivo, lo cual puede estar reduciendo la actividad celular. El yodo es ligeramente soluble en agua y su hidrosolubilidad puede incrementarse en presencia de iones yoduro, produciendo poliyoduros como I^- , I_3^- y I_5^- [112, 146]. Estos poliyoduros en grandes cantidades puede dañar los compuestos citoplasmáticos y de membrana celular [116]. De acuerdo a la literatura, después de liberación de yodo, éste es tóxico en los microorganismos, debido a que puede combinarse irreversiblemente con residuos de tirosina en las proteínas, interfiriendo con la formación de enlaces de hidrógeno en aminoácidos y ácidos nucleicos, oxidando los grupos tiol y reaccionando con sitios de insaturación en lípidos [110], así como provocando oxidación de los compuestos citoplasmáticos y de membrana [180].

En este trabajo, se evaluó el efecto de diferentes tiempos de exposición, encontramos que la viabilidad celular depende del tiempo de exposición al tratamiento con plasma, y que una exposición más corta en el tratamiento con plasma proporciona mejores resultados con respecto a la viabilidad celular y citotoxicidad de los andamios. Además, se encontró que los tiempos de tratamiento mayores de 12 minutos tienen un efecto perjudicial sobre la viabilidad

celular y la citotoxicidad. La mayoría de autores como Sánchez *et al.*, Doval *et al.*, Cruz *et al.*, Arteaga *et al.*, [110, 114-116], quienes realizaron la modificación de diferentes polímeros con tratamiento con plasma del PPy-I, utilizaron un único tiempo de exposición del pirrol (entre 20 y 30 minutos), mientras que la válvula que contiene yodo permaneció abierta a intervalos de tiempo entre 5 y 8 minutos en total. En este contexto y lo encontrado en este trabajo, las investigaciones futuras deberían orientarse hacia más intervalos de tiempo de exposición al plasma de PPy-I entre 0 y 10 minutos. Del mismo modo, la mayoría de los autores mencionados anteriormente requirieron de una exposición de más de 20 minutos de 15 a 25 W para incrementar la biocompatibilidad de los andamios tratados con PPy-I, sin embargo, nuestros resultados indican que, utilizando una potencia de 35 W, se obtiene un andamio no citotóxico a los 6 minutos de exposición, lo cual pareciera indicar que, aumentando la potencia del proceso, se puede disminuir el tiempo de exposición para obtener un andamio con una superficie modificada compatible con actividad celular [110, 114-116].

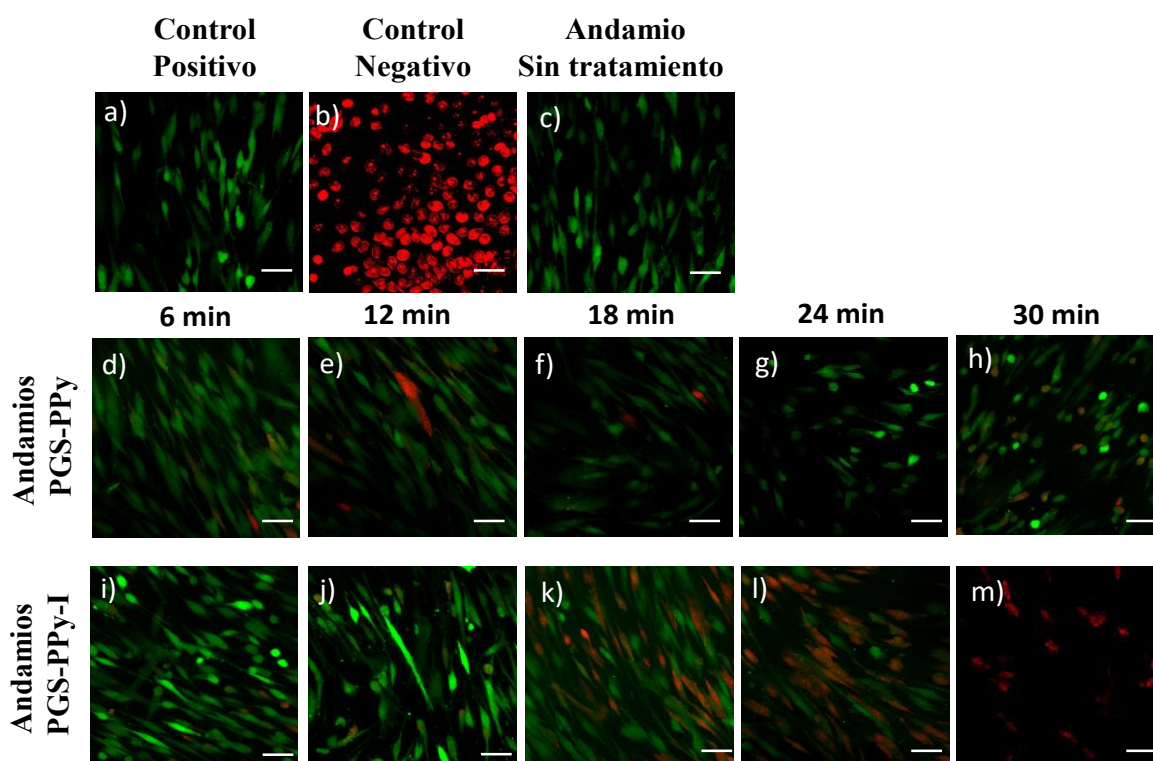


Figura 4.20 Ensayo de tinción LIVE/DEAD; a) control positivo, células cultivadas en DMEM; b) control negativo, células cultivadas en peróxido de hidrogeno; c) andamio sin tratamiento; a-h) andamios tratados con PPy; i-m) andamios tratados con PPy-I. barra 40 μ m

5. Conclusiones

Los análisis por SEM, FTIR y XPS revelaron que las partículas de PPy-I se incorporaron con éxito por polimerización en plasma sobre los andamios de PGS. La cantidad de partículas PPy-I depositadas en los andamios de PGS estuvo fuertemente influenciada por el tiempo de exposición de los andamios al tratamiento con plasma. La incorporación de las partículas PPy-I produjo diferentes grupos funcionales tales como NH, = NH, C≡N junto con la disminución de los enlaces éster. La caracterización por AFM demuestra que hay un claro incremento en la rugosidad conforme se incrementa el tiempo de exposición. Aunque este análisis se realizó en películas, sugiere que las superficies de los andamios también podrían ser afectados modificando su rugosidad. Los resultados de la prueba de tensión revelaron que un tiempo de exposición de 6 minutos al tratamiento con plasma no afectó el módulo de Young de los andamios. Además, el mismo tiempo de exposición no afectó la hidrofiliidad de los andamios.

Con los resultados obtenidos, se verificó el fenotipo troncal de las hDPSCS mediante la expresión de marcadores de superficie. Esto confirma que a partir de pulpas dentales de humano es posible aislar células madre troncales. La modificación superficial a tiempos cortos del PGS del PPy dopado con yodo favorece la adhesión, viabilidad y proliferación celular, el tratamiento con plasma a 6 minutos fue el mejor porque hubo adhesión como se demuestra en las micrografías SEM, además el análisis de proliferación celular mostró que un tiempo de exposición de 6 minutos al tratamiento con plasma produjo el mejor resultado en cuanto a proliferación celular y no citotoxicidad, mientras que tiempos de exposición más largos al tratamiento con plasma tenían un efecto negativo en la proliferación celular de los andamios. Por lo tanto, los andamios tratados durante 6 minutos son candidatos potenciales para pruebas *in vivo* en animales.

En este sentido, el objetivo de estudiar el efecto del tiempo de exposición se cumplió con éxito, demostrando la correlación entre el tiempo de exposición al tratamiento con plasma en las propiedades fisicoquímicas y en las propiedades biológicas de los andamios PGS tratados.

6. Recomendaciones

Con los resultados obtenidos en este trabajo, se aconseja realizar pruebas adicionales a los andamios tratados con plasma de PPy-I, en especial el andamio tratado a 6 minutos, para que este pueda ser potencialmente se utilizadas en pruebas *in vivo*; entre las recomendaciones sugeridas se encuentran:

- Evaluar otro sistema de disolvente que permita un completa eliminación del porógeno.
- Realizar un análisis de liberación productos de lixiviado de los andamios tratados mediante espectroscopía Raman y uv visible.
- Cuantificar mediante uv visible la presencia de grupos NH utilizando un método colorimétrico.
- Evaluar la diferenciación de las hDPSCs en los andamios tratados con plasma de PPy-I hacia linaje osteogénico.

7. Bibliografía

1. F. R. Rose, R. O. Oreffo, Bone tissue engineering: hope vs hype. *Biochemical biophysical research communications*. 292(1): 1-7, 2002.
2. J. Michel, M. Penna, J. Kochen, H. Cheung, Recent advances in hydroxyapatite scaffolds containing mesenchymal stem cells. *Stem Cells International*, 2(1): 1-13, 2015.
3. A. Mata, C. Boehm, A. Fleischman, J. G. Muschler, S. Roy, Growth of connective tissue progenitor cells on microtextured polydimethylsiloxane surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62(4): 499-506, 2002.

4. S. Martino, F. D'Angelo, I. Armentano, J. Kenny, M. A. Orlacchio, Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnology advances*, 30(1): 338-351. 2012.
5. Y. Mohanram, J. Zhang, E. Tsiridis, X. B. Yang, Comparing bone tissue engineering efficacy of HDPPSCs, HBMSCs on 3D biomimetic ABM-P-15 scaffolds in vitro in vivo. *Cytotechnology*, 72(5): 715-730, 2020.
6. F. Asutay, S. Polat, M. Gül, C. Subaşı, S. A. Kahraman, E. Karaöz, The effects of dental pulp stem cells on bone regeneration in rat calvarial defect model: micro-computed tomography histomorphometric analysis. *Archives of oral biology*, 60(12): 1729-1735, 2015.
7. X. Petridis, E. Diamanti, G. Trigas, D. Kalyvas, Kitraki, E. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 43(4): 483-490, 2015.
8. M. Monti, A. Graziano, S. Rizzo, C. Perotti, C. Fante, R. d'Aquino, In vitro in vivo differentiation of progenitor stem cells obtained after mechanical digestion of human dental pulp. *Journal of Cellular Physiology*, 232(3): 548-555, 2017.
9. A. Giuliani, A. Manescu, M. Langer, F. Rustichelli, V. Desiderio, F. Paino, Papaccio, G. Three years after transplants in humans, histological in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: Biological clinical implications. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(4): 316-324, 2013.
10. Y. Li, S. Zhao, X. Nan, H. Wei, J. Shi, A. Li, Repair of human periodontal bone defects by autologous grafting stem cells derived from inflammatory dental pulp tissues. *Stem cell research therapy*, 7(1): 1-9. 2016.
11. J. B. Park, Biomaterials science engineering. Springer Science Business Media. 2012.
12. J. F. Barreto. Regeneración ósea a través de la ingeniería de tejidos: una introducción. RET. *Revista de Estudios Transdisciplinarios*, 1(2): 98-109, 2009.

13. A.J Salgado, O. P. Coutinho, R. L. Reis, Bone tissue engineering: state of the art future trends. *Macromolecular bioscience*, 4(8): 743-765. 2004.
14. S.J. Shieh, J.P. Vacanti. State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. *Surgery*, 137(1): 1-7. 2005.
15. C. M. Conde; F. F Demarco, L. Casagre, J. C Alcazar, J. E. Nör, C. Influence of poly-L-lactic acid scaffold's pore size on the proliferation differentiation of dental pulp stem cells. *Brazilian dental journal*, 26(2): 93-98. 2015.
16. M. Morra, C. Cassinelli, G. Bruzzone, A. Carpi; D. Santi G, R. Giardino, M. Fini, Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: Surface analysis. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 18(1): 40-45, 2003.
17. J.R. Mauney, V. Volloch, D.L. Kaplan, Role of adult mesenchymal stem cells in bone tissue engineering applications: current status future prospects. *Tissue engineering*, 11(5-6): 787-802 2005.
18. D. Logeart-Avramoglou, F. Anagnostou, F R. Bizios, Petite H, Engineering bone: challenges obstacles. *Journal of cellular molecular medicine*, 9(1): 72-84. 2005.
19. I. Serratos, R. Olayo, C. Millán-Pacheco, J. Morales-Corona, J. Vicente-Escobar, A. Soto, R. Godínez-Fernández, Modeling integrin plasma-polymerized pyrrole interactions: chemical diversity relevance for cell regeneration. *Scientific reports*, 9, 1-12, 2019.
20. M. M. Mata-Mira, V. Sánchez-Monroy, G. J. Vázquez-Zapién, Investigación básica con células madre pluripotentes en la escuela médico militar. *Revista de Sanidad Militar*, 68(4): 233-237, 2014.
21. W.K Ovalle, P.C. Nahirney, *Netter's Essential Histology: With Student Consult Access*. Elsevier Health Sciences, 2013.
22. H Takeuchi, N. Nakatsuji, H. Suemori, Endodermal differentiation of human pluripotent stem cells to insulin-producing cells in 3D culture. *Scientific reports*, 4: 4488, 2014.

23. A. P. Puerto, Biocompatibilidad de los poliuretanos-ureas elastomericos segmentados, in materiales. Centro de investigación científica de Yucatán (CICY), 2012.
24. S. Yang, K. Leong, Z. Du, C. Chua, The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue engineering*, 7(6): 679-689, 2001.
25. S.P Bruder, K. Kraus, V. Goldberg, S. Kadiyala, the effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *JBJS*, 80(7): 985-96. 1998.
26. M.F Pittenger, A. Mackay, S. Beck, R. Jaiswal, R. Douglas, J. Mosca, D. Marshak. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, 284(5411): 143-147. 1999
27. N. B. Nardi, L. da Silva Meirelles. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion characterization, *Stem cells*. Springer. 249-282, 2008,
28. D. Baksh, R. Yao, R. S. Tuan, Comparison of proliferative multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord bone marrow. *Stem cells*, 25(6): 1384-1392. 2007
29. S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, K. Bieback, Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells*, 24(5): 1294-1301. 2006.
30. P.A Zuk, M. I. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. Futrell, A. Katz, A. Hedrick, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*, 7(2): 211-228. 2001.
31. M. Konno, A. Hamabe, S. Hasegawa, H. Ogawa, T. Fukusumi, S. Nishikawa, Adipose-derived mesenchymal stem cells regenerative medicine. *Development, growth differentiation*, 55(3): 309-318, 2013.
32. W.J Jurgens, Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell tissue research*, 332(3): 415-426, 2008.

33. K. Bieback, S. Kern, H. Klüter, H. Eichler, Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem cells*, 22(4):625-634. 2004.
34. J.V Almunia, Obtención y caracterización de células madre de pulpa dental humana e interacción con [beta]-fosfato tricálcico. Universidad de Valencia, departamento de estomatología. España, 2013,
35. E. Ledesma, V.M. Mendoza, E. Santiago, Mesenchymal stem cells derived from dental pulp: A review. *Stem cells international*, (20) 2016.
36. O. Nagata, W. Ono, unveiling diversity of stem cells in dental pulp apical papilla using mouse genetic models: a literature review. *Cell Tissue Research*, 1-14. 2020.
37. P. T. Sharpe, Dental mesenchymal stem cells. *Development*, 143(13): 2273-2280, 2016.
38. R. Bansal, A. Jain, Current overview on challenges in regenerative endodontics. *Journal of conservative dentistry: JCD*, 18(1): 1, 2015.
39. M. Yan, Y. Zhang, C. Tang, J. Yu, A journey from dental pulp stem cells to a bio-tooth. *Stem Cell Reviews Reports*, 7(1): 161-171, 2011.
40. D. Kwon, J. Kwon, S. Park, J. Park, S. Jang, X. Yin, W. D. Kim, A computer-designed scaffold for bone regeneration within cranial defect using human dental pulp stem cells. *Scientific reports*, 5(1): 1-12, 2015.
41. L. García Torres, F. Flores, L. Santibáñez, Células madre de la pulpa dental (DPSC): perspectivas terapéuticas en enfermedades crónico degenerativas. *Salud Jalisco*, 4(3): 168-177, 2018.
42. A. Sáenz, M. Macías, A. Canabal, J. Niño, J. O'meara, R. Bahamón, In Vitro Evaluation of the Adhesion of Mesenchymal Stem Cells to Three-Dimensional Printed Matrices. 36(77), 2017.
43. S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahim, P. Robey, S. Shi, Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25): 13625-13630, 2000.

44. G. Huang, S. Gronthos, S. Shi, Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology role in regenerative medicine. *Journal of dental research*, 88(9): 792-806, 2009.
45. E. Karaöz, P. Demircan, Ö Sağlam, A. Aksoy, F. Kaymaz, G. Duruksu, Human dental pulp stem cells demonstrate better neural epithelial stem cell properties than bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochemistry cell biology*, 136(4): 455. 2011.
46. M. Hata, K. Naruse, S. Ozawa, Y. Kobayashi, N. Nakamura, N. Kojima, Y. Tanaka, Mechanical stretch increases the proliferation while inhibiting the osteogenic differentiation in dental pulp stem cells. *Tissue Engineering Part A*, 19(5-6): 625-633, 2012.
47. M. Murakami, H. Horibe, K. Iohara, Y. Hayashi, Y. Osako, Y. Takei, M. Nakashima, The use of granulocyte-colony stimulating factor induced mobilization for isolation of dental pulp stem cells with high regenerative potential. *Biomaterials*, 34(36): 9036-9047, 2013.
48. Y. Wen, F. Wang, W. Zhang, Y. Li, M. Yu, X. Nan, X. Pei, Application of induced pluripotent stem cells in generation of a tissue-engineered tooth-like structure. *Tissue Engineering Part A*, 18(15-16): 1677-1685, 2012.
49. R. K. Das, O. F. Zouani, A review of the effects of the cell environment physicochemical nanoarchitecture on stem cell commitment. *Biomaterials*, 35(20): 5278-5293, 2014.
50. R. d'Aquino, G. Papaccio, G. Laino, A. Graziano, Dental pulp stem cells: a promising tool for bone regeneration. *Stem cell reviews*, 4(1): 21-26. 2008.
51. L. Casagre, M. Cordeiro, S. Nör, Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*, 99(1): 1-7, 2011.
52. M. Dominici, K. Le Blanc K, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, E. Horwitz, Minimal criteria for defining multipotent; mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4): 315-317, 2006.

53. H. Mizuno, P. Zuk, M. Zhu, P. Lorenz, P. Benhaim, M. Hedrick, Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells. *Plastic reconstructive surgery*, 109(1): 199-209, 2002.
54. P.H Ashjian, A. S Elbarbary, B. Edmonds B, D. Ugarte, M. Zhu, P. Zuk, M. Hedrick, In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors. *Plastic reconstructive surgery*, 111(6): 1922-1931, 2003.
55. R. Gonçalves, C. L. da Silvaa, J. M Cabralb, E. D. Zanzania, G. Almeida-Poradaa, A Stro-1+ human universal stromal feeder layer to exp/maintain human bone marrow hematopoietic stem/progenitor cells in a serum-free culture system. *Experimental hematology*, 34(10): 1353-1359. 2006.
56. M. Clementini, A. Morlupi, L. Canullo, C. Agrestini, A. Barlattani, Success rate of dental implants inserted in horizontal vertical guided bone regenerated areas: a systematic review. *International journal of oral maxillofacial surgery*, 41(7): 847-852, 2012.
57. Z. Li, Y. Gong, S. Sun, Y. Du, D. Lü, X. Liu, M Long, Differential regulation of stiffness, topography, dimension of substrates in rat mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 34(31): 7616-7625, 2013.
58. Y. Liu, J. Lim. S. H. Teoh, Development of clinically relevant scaffolds for vascularised bone tissue engineering. *Biotechnology advances*, 31(5): 688-705, 2013.
59. A. Patel, A. K. Gaharwar, G. Iviglia, H. Zhang, S. Mukundan, S. Mihaila, M. A. Khademhosseini, Highly elastomeric poly (glycerol sebacate)-co-poly (ethylene glycol) amphiphilic block copolymers. *Biomaterials*, 34(16): 3970-3983. 2013.
60. X. Zhang, C. Jia, X. Qiao, T. Liu, K. Sun, Porous poly (glycerol sebacate)(PGS) elastomer scaffolds for skin tissue engineering. *Polymer Testing*, 54:118-125. 2016.
61. Y. Wang, G. A. Ameer, B. J. Sheppard, R. A. Langer, tough biodegradable elastomer. *Nature biotechnology*, 20(6): 602, 2002.
62. M.A Heuschkel, A. Leitolis; J. G. Roderjan, P. H. Suss, C. Luzia, M. A. Stimamiglio, In vitro evaluation of bovine pericardium after a soft

- decellularization approach for use in tissue engineering. *Xenotransplantation*, 26(2): 12464. 2019.
63. C.A. Sundback, J. Y. Shyu, Y. Wang, W. C. Faquin, R. S. Langer, J. P. Vacanti, T. A. Hadlock, Biocompatibility analysis of poly (glycerol sebacate) as a nerve guide material. *Biomaterials*, 26(27): 5454-5464. 2005.
 64. W. Cai, L. Liu, Shape-memory effect of poly (glycerol–sebacate) elastomer. *Materials Letters*, 62(14): 2171-2173, 2008.
 65. H. Shi, Q. Gan, X. Liu, Y. Ma, J. Hu, Y. Yuan, C. Liu, Poly (glycerol sebacate)-modified polylactic acid scaffolds with improved hydrophilicity, mechanical strength bioactivity for bone tissue regeneration. *RSC Advances*, 5(97): 79703-79714, 2015
 66. Pech, W.A.T., Sintesis y caracterización de un soporte de poli(glicerol sebacato) para uso potencias en regeneracion de nervio periferico,, in *Materiales poliméricos*. 2013, Centro de investigación Científica de Yucatán. p. 80.
 67. R. Rai, M. Tallawi, Grigore, A. Boccaccini, Synthesis, properties biomedical applications of poly (glycerol sebacate)(PGS): a review. *Progress in polymer science*, 37(8): 1051-1078, 2012.
 68. I. Pomerantseva, N. Krebs, A. Hart, C. M. Neville, A. Y. Huang, C. Sundback, Degradation behavior of poly (glycerol sebacate). *Journal of Biomedical Materials Research Part A*: 91(4): 1038-1047. 2009.
 69. Q. Z. Chen, A. Bismarck, U. Hansen, S. Junaid, M. Q. Tran, S. E. Harding, A. R. Boccaccini, Characterisation of a soft elastomer poly (glycerol sebacate) designed to match the mechanical properties of myocardial tissue. *Biomaterials*, 29(1): 47-57, 2008.
 70. C. Sundback, J. McFadden, A. Hart, K. M. Kulig, A. M. Wiel, M. Pereira, P. T. Masiakos, Behavior of poly (glycerol sebacate) plugs in chronic tympanic membrane perforations. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 100(7): 1943-1954, 2012.

71. A.G. Mitsak,, A.M. Dunn, S.J. Hollister. Mechanical characterization non-linear elastic modeling of poly (glycerol sebacate) for soft tissue engineering. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 11: 3-15, 2012.
72. R.F. Wallin, E. Arscott, A practical guide to ISO 10993-5: Cytotoxicity. *Medical Device Diagnostic Industry*, 20: 96-98, 1998.
73. Q. Chen, H. Ishii, G. A. Thouas, A. R. Lyon, J. S. Wright, J. Blaker, S. E. Harding, An elastomeric patch derived from poly (glycerol sebacate) for delivery of embryonic stem cells to the heart. *Biomaterials*, 31(14): p. 3885-3893, 2010
74. S. Sant, D. Iyer, A. K. Gaharwar, A. Patel, A Khademhosseini, Effect of biodegradation de novo matrix synthesis on the mechanical properties of valvular interstitial cell-seeded polyglycerol sebacate–polycaprolactone scaffolds. *Acta biomaterialia*, 9(4): 5963-5973, 2013.
75. D. Motlagh, J. Yang, K. Y. Lui, A. R. Webb, G. A. Ameer, Hemocompatibility evaluation of poly (glycerol-sebacate) in vitro for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, 27(24): 4315-4324, 2006.
76. J.M. Kempainen, S.J. Hollister, Tailoring the mechanical properties of 3D-designed poly (glycerol sebacate) scaffolds for cartilage applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 94(1): 9-18, 2010.
77. C.D. Pritchard, K. M. Arnér, R. S. Langer, F. K. Ghosh, Retinal transplantation using surface modified poly (glycerol-co-sebacic acid) membranes. *Biomaterials*, 31(31): 7978-7984, 2010.
78. A. Aluja, G. R. Gutiérrez, E. I. Ibarra, F. C. Lomelí, Declaración Mexicana y Principios Básicos de la Experimentación en Animales. *Boletín de la Comisión Nacional de Bioética*, 1(21): 9-10, 1994.
79. A. Gallardo, C. Bordenave, J. C. Orellano, P. Galliano, J. M. Porto Pérez, Evaluación de ensayos in vivo e in vitro de materiales para implantes ortopédicos: estudio preliminar. *Revista Asociación Argentina. Ortopedia. Traumatología*, 10-7, 1998.
80. D. Lin, K. Yang, W. Tang, Y. Liu, Y. Yuan, C. Liu, A poly (glycerol sebacate)-coated mesoporous bioactive glass scaffold with adjustable mechanical strength,

- degradation rate, controlled-release cell behavior for bone tissue engineering. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, 131:1-11, 2015.
81. S. Zaky, K. W. Lee, J. Gao, A. Jensen, K. Verdelis, Y. Wang, C. Sfeir, Poly (glycerol sebacate) elastomer supports bone regeneration by its mechanical properties being closer to osteoid tissue rather than to mature bone. *Acta biomaterialia*, 54: 95-106. 2017.
 82. A. Tevlek, P. Hosseinian, C. Ogutcu, M. Turk, H. M. Aydin, Bi-layered constructs of poly (glycerol-sebacate)- β -tricalcium phosphate for bone-soft tissue interface applications. *Materials Science Engineering: C*, 72: 316-324, 2017.
 83. K. Yang, J. Zhang, X. Ma, Y. Ma, C. Kan, H. Ma, C. Liu, β -tricalcium phosphate/poly (glycerol sebacate) scaffolds with robust mechanical property for bone tissue engineering. *Materials Science Engineering: C*, 56: 37-47, 2015.
 84. S.H. Zaky, K. W. Lee, J. Gao, A. Jensen, J. Close, Y. Wang, C. Sfeir, Poly (glycerol sebacate) elastomer: a novel material for mechanically loaded bone regeneration. *Tissue Engineering Part A*, 20(1-2): 45-53, 2013.
 85. S.H. Zaky, C. K. Hangadora, M. A. Tudares, J. Gao, A. Jensen, Y. Wang, A. J. Almarza, Poly (glycerol sebacate) elastomer supports osteogenic phenotype for bone engineering applications. *Biomedical Materials*, 9(2): 025003. 2014.
 86. N.T. Jiménez, J. C. Munévar, J. M. González, C. Infante, S. Lara, In vitro response of dental pulp stem cells in 3D scaffolds: A regenerative bone material. *Heliyon*, 4(9): e00775, 2018.
 87. M. Frydrych, B. Chen, Large three-dimensional poly (glycerol sebacate)-based scaffolds a freeze-drying preparation approach. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(48): p. 6650-6661, 2013.
 88. C.M. Murphy, M.G. Haugh, F.J. O'brien, The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(3): 461-466, 2010.
 89. F. Yi, D. A. La Van, Poly (glycerol sebacate) nanofiber scaffolds by core/shell electrospinning. *Macromolecular bioscience*, 8(9): 803-806, 2008.

90. S. Sant, C. M. Hwang, S. H. Lee, A. Khademhosseini, Hybrid PGS–PCL microfibrillar scaffolds with improved mechanical biological properties. *Journal of tissue engineering regenerative medicine*, 2011. 5(4): 283-291.
91. Y. Li, W. D. Cook, C. Moorhoff, W. Huang, Q. Z. Chen, Synthesis, characterization properties of biocompatible poly (glycerol sebacate) pre-polymer gel. *Polymer international*, 62(4): 534-547, 2013.
92. R. Ravichran, J. R. Venugopal, S. Sundarrajan, S. Mukherjee, R. Sridhar, S. Ramakrishna, Minimally invasive injectable short nanofibers of poly (glycerol sebacate) for cardiac tissue engineering. *Nanotechnology*, 23(38): 385102. 2012.
93. J.L. Ifkovits, J. J. Devlin, T. P. Martens, G. Vunjak-Novakovic, J. A. Burdick, Biodegradable fibrous scaffolds with tunable properties formed from photocrosslinkable poly (glycerol sebacate). *ACS applied materials interfaces*, 1(9): 1878, 2009.
94. T. Liu, W. K. Teng, B. Chan, S. Y. Chew, Photochemical crosslinked electrospun collagen nanofibers: synthesis, characterization neural stem cell interactions. *Journal of biomedical materials research Part A*, 95(1): 276-282, 2010.
95. J.L. Ifkovits, J.J. Devlin, G. Eng, T. P. Martens, G. Vunjak-Novakovic, J. A. Burdick, Biodegradable fibrous scaffolds with tunable properties formed from photo-cross-linkable poly (glycerol sebacate). *ACS applied materials interfaces*, 1(9): 1878-1886, 2009.
96. R. Ravichran, J.R. Venugopal, S. Sundarrajan, S. Mukherjee, S Ramakrishna, Poly (glycerol sebacate)/gelatin core/shell fibrous structure for regeneration of myocardial infarction. *Tissue Engineering Part A*, 17(9-10): 1363-1373, 2011.
97. J. Gao, P.M. Crapo, Y. Wang, Macroporous elastomeric scaffolds with extensive micropores for soft tissue engineering. *Tissue engineering*, 12(4): 917-925. 2006.
98. R. Rai, M. Tallawi, N. Barbani, C. Frati, D. Madeddu, S. Cavalli, E Rosellini, Biomimetic poly (glycerol sebacate)(PGS) membranes for cardiac patch application. *Materials Science Engineering: C*, 33(7): 3677-3687, 2013.

99. W.L. Murphy, M. C. Peters, D. Kohn, D. J. Mooney, Sustained release of vascular endothelial growth factor from mineralized poly (lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, 21(24): 2521-2527, 2000.
100. C.D. Pritchard, K. M. Arnér, R. A. Neal, W. L. Neeley, P. Bojo, E. Bachelder, F. K. Ghosh, The use of surface modified poly (glycerol-co-sebacic acid) in retinal transplantation. *Biomaterials*, 31(8): 2153-2162, 2010.
101. V.L. Sales, G. C. Engelmayer Jr, J. A. Johnson Jr, J. Gao, Y. Wang, M. S. Sacks, J. E. Mayer Jr, Protein precoating of elastomeric tissue-engineering scaffolds increased cellularity, enhanced extracellular matrix protein production, differentially regulated the phenotypes of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation*, 116(11): 55-63, 2007.
102. E. Colín, M. G. Olayo, G. J. Cruz, L. Carapia, J. Morales, R. Olayo, Affinity of amine-functionalized plasma polymers with ionic solutions similar to those in the human body. *Progress in Organic Coatings*, 64(2-3): 322-326, 2009.
103. J. Friedrich, Mechanisms of plasma polymerization—reviewed from a chemical point of view. *Plasma Processes Polymers*, 8(9): 783-802, 2011.
104. T. Theerathanagorn, B. Thavornytikarn, W. Janvikul, Preparation Characterization of Plasma-Treated Porous Poly (glycerol sebacate) Scaffolds. *Advanced Materials Research*. 747, 182-185, 2013.
105. R. Olayo, C. Ríos, H. Salgado-Ceballos, G. J. Cruz, J. Morales, M. Olayo, G. Ruiz, A. Tissue spinal cord response in rats after implants of polypyrrole polyethylene glycol obtained by plasma. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(2): 817-826. 2008.
106. G. Cruz, M. G. Olayo, O. G. López, L. M. Gómez, J. Morales, R Olayo, Nanospherical particles of polypyrrole synthesized doped by plasma. *Polymer*, 51(19): 4314-4318, 2010.
107. J.L. Yagüe, S. Borrós, Conducting plasma polymerized polypyrrole thin films as carbon dioxide gas sensors. *Plasma Processes Polymers*, 9(5): 485-490, 2012.
108. J.O. Ramirez Fernez. Hepatocyte culture in a radial-flow bioreactor with plasma polypyrrole coated scaffolds. *Instituto de Ingeniería y Tecnología*, 2015.

109. E. Zuñiga-Aguilar, R. Olayo, O. Ramírez-Fernández, J. Morales, R. Godínez, Nerve cells culture from lumbar spinal cord on surfaces modified by plasma pyrrole polymerization. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(7): 729-747, 2014.
110. N.C. Islas Arteaga, A. Raya Rivera, D. R. Esquiliano Rendon, J. Morales-Corona, P. G. Ontiveros-Nevarés, M. G. Flores Sánchez, R. Olayo, Electrospun scaffolds with surfaces modified by plasma for regeneration of articular cartilage tissue: a pilot study in rabbit. *International Journal of Polymeric Materials Polymeric Biomaterials*, 68(18): 1089-1098, 2019.
111. L. Alvarez-Mejia, J. Morales, G. J. Cruz, M. G. Olayo, R. Olayo, A. Díaz-Ruiz, O. Fabela-Sánchez, Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants treadmill training. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26(7): 209, 2015.
112. M.B. Runge, M. Dadsetan, J. Baltrusaitis, A. M. Knight, T. Ruesink, E. Lazcano, M. J. Yaszemski, The development of electrically conductive polycaprolactone fumarate–polypyrrole composite materials for nerve regeneration. *Biomaterials*, 31(23): 5916-5926, 2010.
113. G.J. Cruz, R. Mondragón-Lozano, A. Diaz-Ruiz, J. Manjarrez, R. Olayo, H. Salgado-Ceballos, M. Méndez-Armenta, Plasma polypyrrole implants recover motor function in rats after spinal cord transection. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 23(10): 2583-2592, 2012.
114. R. Román-Doval, M. M. Tellez-Cruz, H. Rojas-Chávez, H. Cruz-Martínez, G. Carrasco-Torres, V. R. Vásquez-Garzón, Enhancing electrospun scaffolds of PVP with polypyrrole/iodine for tissue engineering of skin regeneration by coating via a plasma process. *Journal of Materials Science*, 54(4): 3342-3353, 2019.
115. M.G. Flores-Sánchez, A. M. Raya-Rivera, D. R. Esquiliano-Rendon, P. G. Ontiveros-Nevarés, N. C. Islas-Arteaga, J. Morales-Corona, R. Olayo, Scaffolds of polylactic acid/hydroxyapatite coated by plasma with polypyrrole-iodine for the generation of neo-tissue–bone in vivo: Study in rabbit. *International Journal of Polymeric Materials Polymeric Biomaterials*, 67(7): 427-437, 2018.

116. Y. Cruz, E. Muñoz, E. Y. Gomez-Pachón, J. Morales-Corona, J. Olayo-Lortia, R. Olayo, R. Olayo-Valles, Electrospun PCL-protein scaffolds coated by pyrrole plasma polymerization. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 30(10): 832-845, 2019.
117. L. Jin, T. Wang, Z. Q. Feng, M. Zhu, M. K. Leach, Y. I. Naim, Q. Jiang, Fabrication characterization of a novel fluffy polypyrrole fibrous scaffold designed for 3D cell culture. *Journal of Materials Chemistry*, 22(35): 18321-18326, 2012.
118. Y. C. Cheng, C. H. Chen, H. W. Kuo, T. L. Yen, Y. Y. Mao, W.W. Hu, Electrical Stimulation through Conductive Substrate to Enhance Osteo-Differentiation of Human Dental Pulp-Derived Stem Cells. *Applied Sciences*, 9(18): 3938, 2019.
119. W. Hu, Y. T. Hsu, Y. C. Cheng, C. Li, R. C. Ruaan, C. Chien, C. W Tsao, Electrical stimulation to promote osteogenesis using conductive polypyrrole films. *Materials Science Engineering: C*, 37: 28-36, 2014.
120. Y. Gu, Y. Bai, D. Zhang, Osteogenic stimulation of human dental pulp stem cells with a novel gelatin-hydroxyapatite-tricalcium phosphate scaffold. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106(7): 1851-1861. 2018.
121. J.Y. Lee, C.E. Schmidt, Amine-functionalized polypyrrole: Inherently cell adhesive conducting polymer. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 103(6): 2126-2132, 2015.
122. M.A. Osorio-Delgado, L. J. Henao-Tamayo, J. A. Velásquez-Cock, A. I. Cañas-Gutierrez, L. M. Restrepo-Múnera, P. F. Gañán-Rojo, C. I. Castro-Herazo, Biomedical applications of polymeric biomaterials. *Dyna*, 84(201):241-252. 2017.
123. J.A.A. Romero, D.M.P. Guerrero, V.M.R. Pardo, Células madre mesenquimales: características biológicas y aplicaciones clínicas. *Nova*, 5(8), 2007.
124. M.M. Ser, C.A. Ferreira, Synthesis characterization of a conductive self-healing composite. *Synthetic Metals*, 243: 58-66, 2018
125. R.F. Wallin, A Practical Guide to ISO 10993-12: Sample Preparation Reference Materials, 1998.

126. J. Reignier, M.A. Huneault, Preparation of interconnected poly (ϵ -caprolactone) porous scaffolds by a combination of polymer salt particulate leaching. *Polymer*, 47(13): 4703-4717, 2006.
127. Y. Wang, G. A. Ameer, B. J. Sheppard, R. A. Langer, tough biodegradable elastomer. *Nature biotechnology*, 20(6): 602-606, 2002.
128. L. Zhou, H. He, C. Jiang, S. He, Preparation characterization of poly (glycerol sebacate)/cellulose nanocrystals elastomeric composites. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(27), 2015.
129. S. Miyashita, N. E. Ahmed, M. Murakami, K. Iohara, T. Yamamoto, H. Horibe, M. Nakashima, Mechanical forces induce odontoblastic differentiation of mesenchymal stem cells on three-dimensional biomimetic scaffolds. *Journal of tissue engineering regenerative medicine*, 11(2): 434-446, 2017.
130. J. Han, D. S. Kim, H. Jang, H. R. Kim, H. W. Kang, Bioprinting of three-dimensional dentin–pulp complex with local differentiation of human dental pulp stem cells. *Journal of tissue engineering*, 10, 1-10, 2019.
131. W.T. Pech, Sintesis y caracteriacion de un soporte de poli(glicerol sebacato), in Posgrado Materiales Polimericos. Centro de Investigación Cinética de Yucatán, 80, 2013.
132. J.C. Sánchez-Pech, R. Rosales-Ibáñez, J.V. Cauich-Rodríguez, H.J. Carrillo-Escalante, A. Rodríguez-Navarrete, A. Avila-Ortega, F. Hernández-Sánchez, Design, synthesis, characterization, cytotoxicity of PCL/PLGA scaffolds through plasma treatment in the presence of pyrrole for possible use in urethral tissue engineering. *Journal of Biomaterials Applications*, 34(6) 440-850, 2020
133. A. Kumar, S. Murugavel, A. Aditya, A. R. Boccaccini, Mesoporous 45S5 bioactive glass: synthesis, in vitro dissolution biomineralization behavior. *Journal of Materials Chemistry B*, 5(44): 8786-8798, 2017
134. P. Kerativitayanan, A.K. Gaharwar, Elastomeric mechanically stiff nanocomposites from poly (glycerol sebacate) bioactive nanosilicates. *Acta biomaterialia*, 26: 34-44, 2015.

135. M. Gultekinoglu, Ş. Öztürk, B. Chen, Edirisinghe, M Ulubayram, K. Preparation of poly (glycerol sebacate) fibers for tissue engineering applications. *European Polymer Journal*, 121: 109297, 2019.
136. D. Dippold, M. Tallawi, S. Tansaz, J. A. Roether, A.R. Boccaccini, Novel electrospun poly (glycerol sebacate)–zein fiber mats as candidate materials for cardiac tissue engineering. *European Polymer Journal*, 75: 504-513, 2016.
137. X. Gong, C. Y. Tang, Y. Zhang, C. T. Wong, S. Wu, J. Liu, Fabrication of graded macroporous poly (lactic acid) scaffold by a progressive solvent casting/porogen leaching approach. *Journal of applied polymer science*, 125(1): 571-577, 2012.
138. Sun, Z.-J., Chen, C., Sun, M. Z., Ai, C. H., Lu, X. L., Zheng, Y. F Dong, D. L., The application of poly (glycerol–sebacate) as biodegradable drug carrier. *Biomaterials*, 2009. 30(28): p. 5209-5214.
139. G. Cruz, J. Morales, R. Olayo, Films obtained by plasma polymerization of pyrrole. *Thin solid films*, 1999. 342(1-2): p. 119-126.
140. B. Paosawatyanong, K. Tapaneeyakorn, W. Bhanthumnavin, AC plasma polymerization of pyrrole. *Surface Coatings Technology*, 204(18): 3069-3072. 2010.
141. M. González-Torres, M. G. Olayo, G. J. Cruz, L. M. Gómez, V. Sánchez-Mendieta, F. González-Salgado, XPS study of the chemical structure of plasma biocopolymers of pyrrole ethylene glycol. *Advances in Chemistry*, 2014, 1-8, 2014.
142. J. Zhang, M. Z. Wu, T. S. Pu, Z. Y. Zhang, R. P. Jin, Z. S. Tong, J. Q. Cao, Investigation of the plasma polymer deposited from pyrrole. *Thin solid films*, 307(1-2): 14-20, 1997.
143. M. González-Torres, M. G. Olayo, G. J. Cruz, L. M. Gómez, V. Sánchez-Mendieta, F. González-Salgad. XPS study of the chemical structure of plasma biocopolymers of pyrrole ethylene glycol. *Advances in Chemistry*, 2014, 1-8, 2014.

144. B. Paosawatyanong, K. Tapaneeyakorn, W. Bhanthumnavin, AC plasma polymerization of pyrrole. *Surface Coatings Technology*, 204(18-19): 3069-3072, 2010.
145. T. Kojima, H. Takaku, Y. Urata, K. Gotoh, Pyrolysis GC/MS studies on plasma-polymerized pyrrole. *Journal of applied polymer science*, 48(8):1395-1398. 1993.
146. Y. Wang, G.A. Sotzing, R. Weiss, Preparation of conductive polypyrrole/polyurethane composite foams by in situ polymerization of pyrrole. *Chemistry of Materials*, 20(7): 2574-2582, 2008.
147. J. Wang, K. Neoh, E. Kang, Comparative study of chemically synthesized plasma polymerized pyrrole thiophene thin films. *Thin Solid Films*, 446(2): 205-217, 2004.
148. K. Bazaka, M. Jacob, Effects of iodine doping on optoelectronic chemical properties of polyterpenol thin films. *Nanomaterials*, 7(1): 11. 2017.
149. A. Dhillon, A. Kaur, A. K. Srivastava, D. K. Avasthi, Experimental investigations of semi-crystalline plasma polymerized polypyrrole for surface coating. *Progress in Organic Coatings*, 69(4): 396-401, 2010.
150. R. Dams, D. Vangeneugden, D. Verze, Atmospheric pressure plasma polymerization of in situ doped polypyrrole. *Open Plasma Phys. J*, 6: 7-13. 2013.
151. J. Luo, Y. Deng, Y. Sun, Antimicrobial activity biocompatibility of polyurethane iodine complexes. *Journal of Bioactive Compatible Polymers*, 25(2): 185-206. 2010.
152. H. Naorem, S.D. Devi, Spectrophotometric determination of the formation constant of triiodide ions in aqueous-organic solvent or polymer mixed media both in absence presence of a surfactant. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular Biomolecular Spectroscopy*, 101: 67-73, 2013.
153. P. Moroder, M. B. Runge, H. Wang, T. Ruesink, L. Lu, R. J. Spinner, M. J. Yaszemski, Material properties electrical stimulation regimens of polycaprolactone fumarate-polypyrrole scaffolds as potential conductive nerve conduits. *Acta biomaterialia*, 7(3): 944-953, 2011.

154. C. S. Park, E. Y. Jung, D. H. Kim, D. Y. Kim, H. K. Lee, B. J. Shin, H. S. Tae, Atmospheric pressure plasma polymerization synthesis characterization of polyaniline films doped with without iodine. *Materials*, 10(11): 1272, 2017.
155. J. Morales Corona, E. Pérez-Tejada, C. R. Montiel, V. H. Torres, R. Olayo, Modificación superficial por plasma aplicada a biomateriales. *La Física Biológica en México: Temas Selectos*, 2: 195-205, 2008.
156. L. Groenewoud, G. H. M. Engbers, R. White, J. Feijen, On the iodine doping process of plasma polymerised thiophene layers. *Synthetic metals*, 125(3): 429-440, 2001.
157. V. Varade, G. V. Honnavar, P. Anjaneyulu, K. P. Ramesh, R. Menon, Probing disorder transport properties in polypyrrole thin-film devices by impedance Raman spectroscopy. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 46(36): 365306. 2013
158. Y.W. Lin, T.M. Wu, Synthesis characterization of water-soluble polypyrrole/multi-walled carbon nanotube composites. *Polymer International*, 60(3): 382-388, 2011.
159. L. n. Fan, X. Xu, A stable iodine-doped multi-walled carbon nanotube-polypyrrole composite with improved electrical property. *Composites Science Technology*, 118: 264-268, 2015.
160. H.S. Abdullah, Electrochemical polymerization Raman study of polypyrrole polyaniline thin films. *International Journal of Physical Sciences*, 7(38): 5468-5476, 2012.
161. H.N.T. Le, M. C. Bernard, B. Garcia-Renaud, C. Deslouis, Raman spectroscopy analysis of polypyrrole films as protective coatings on iron. *Synthetic Metals*, 140(2-3): 287-293, 2004.
162. K. Crowley, J. Cassidy, In situ resonance Raman spectroelectrochemistry of polypyrrole doped with dodecylbenzenesulfonate. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 547(1): 75-82, 2003.
163. P. Galář, J. Khun, D. Kopecký, V. Scholtz, M. Trchová, A. Fučíková, L. Fišer, Influence of non-thermal plasma on structural electrical properties of globular

- nanostructured conductive polymer polypyrrole in water suspension. *Scientific reports*, 7(1): 15068, 2017.
164. L. Fan, X. Xu, A simple strategy to enhance electrical conductivity of nanotube-conjugate polymer composites via iodine-doping. *RSC Advances*, 5(95): 78104-78108. 2015.
 165. A. Kaynak, R. Beltran, Effect of synthesis parameters on the electrical conductivity of polypyrrole-coated poly (ethylene terephthalate) fabrics. *Polymer international*, 52(6): 1021-1026, 2003.
 166. Z. Yildiz, I. Usta, A. Gungor, Investigation of the electrical properties electromagnetic shielding effectiveness of polypyrrole coated cotton yarns. *Fibres Textiles in Eastern Europe*, 2013.
 167. C. Walter, V. Brüser, A. Quade, K. D. Weltmann, Structural Investigations of Composites Produced from Copper Polypyrrole with a Dual PVD/PE-CVD Process. *Plasma Processes Polymers*, 6(12): 803-812, 2009.
 168. J. Zhou, E.R. Fisher, Synthesis properties of plasma-polymerized polypyrrole/Au composite nanofibers. *Journal of nanoscience nanotechnology*, 4(5): 539-547, 2004.
 169. N. Su, H. B. Li, S. J. Yuan, S. P. Yi, E. Q. Yin, Synthesis characterization of polypyrrole doped with anionic spherical polyelectrolyte brushes. *Express Polymer Letters*, 6(9): 697-705, 2012.
 170. L.I. Kravets, A. B. Gilman, M. Y. Yablokov, V. Satulu, B. Mitu, G. A. Dinescu, novel technique for fabrication of nanofluidic devices with polymer film formed by plasma polymerization. *High Temperature Material Processes: An International Quarterly of High-Technology Plasma Processes*, 19(1): 2015.
 171. B. G. Keselowsky, D. M. Collard, A. J. García, Surface chemistry modulates fibronectin conformation directs integrin binding specificity to control cell adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*: 66(2): 247-259, 2003.

172. P. Šimek, K. Klímová, D. Sedmidubský, O. Jankovský a, M. Pumera, Z. Sofe. Towards graphene iodide: iodination of graphite oxide. *Nanoscale*, 7(1): 261-270, 2015.
173. C. Wochnowski, S. Metev, UV-laser-assisted synthesis of iodine-doped electrical conductive polythiophene. *Applied surface science*, 186(1-4): 34-39, 2002.
174. G. Lota, J. Tyczkowski, P. Makowski, J. Balcerzak, K. Lota, I. Acznik, D. Pęziak-Kowalska, The modified activated carbon treated with a low-temperature iodine plasma used as electrode material for electrochemical capacitors. *Materials Letters*, 175: 96-100, 2016.
175. Q. Han, C. Hu, F. Zhao, Z. Zhang, N. Chen, L. Qu, One-step preparation of iodine-doped graphitic carbon nitride nanosheets as efficient photocatalysts for visible light water splitting. *Journal of Materials Chemistry A*, 3(8): 4612-4619, 2015.
176. J.C. Palacios, M.G. Olayo, G.J. Cruz, Metallic Interaction in Polythiophene-Ti Plasma Composites. *Open Journal of Polymer Chemistry*, 2013. 3(02): p. 34.
177. E. Pérez-Tejada, J. Morales Corona, L. E. Gómez Quiróz, M. Gutierrez-Ruiz, R. Olayo, Effect of synthesis variables of plasma synthesized polymers on growth of HepG2 cells. *Biocell*, 41(2). 2017.
178. Y.K. de Carvalho, N. M. Argôlo Neto, C. E. Ambrósio, L. D. Oliveira, A. R. Rocha, J. B. Silva, F. R. Alves, Isolation, expansion differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(6): 590-598, 2015.
179. H. Castano, E. A. O'Rear, P. S. McFetridge, V. I. Sikavitsas, Polypyrrole thin films formed by admicellar polymerization support the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Macromolecular bioscience*, 4(8): 785-794, 2004.
180. C.E. Barnes, Biocidal complex dressing formed therefrom. U.S. Patent No 5,051,256, 1991.

